Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr.med. Ernst J.M. Helmreich

DIE WIRKUNG VON PROSTAGLANDIN E_1 AUF ADENYLATCYCLASE-AKTIVITÄT UND LIPID-PHASENÜBERGÄNGE DER THROMBOZYTENMEMBRAN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Józef Mruk
aus Kraków

Würzburg, den 22. Februar 1980

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr.med. Ernst J.M. Helmreich

DIE WIRKUNG VON PROSTAGLANDIN E_1 AUF ADENYLATCYCLASE-AKTIVITÄT UND LIPID-PHASENÜBERGÄNGE DER THROMBOZYTENMEMBRAN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Józef Mruk
aus Kraków

Würzburg, den 22. Februar 1980

Referent: Professor Dr.med. Ernst J.M. Helmreich

Korreferent: Professor Dr.med.Dr.med.h.c. Josef Ströder

Dekan: Professor Dr.med. Karl-Heinrich Wulf

Tag der mündlichen Prüfung 27. März 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

Meinen Eltern

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543521_0059

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
Abkürzungen		
I.	EINLEITUNG	1
II.	THEORETISCHER TEIL	4
1.	Die Zellmembran	4
1.1	Struktur und Lipidorganisation der Membran	4
1.2	Liposomen als Modell der Zellmembran	6
2.	Struktur und Biosynthese der Prostaglandine	7
3.	Thrombozyten als Testsystem	9
3.1	Morphologie und Physiologie	9
3.2	Thrombozyten und Membranfluidität	11
3.3	Die Rolle der Prostaglandine bei der Funktion der Thrombozyten	11
3.4	PGE_1 als Modellsubstanz	13
4.	Messung von Fluiditätsänderungen der Membran mit Hilfe von Pyrendecansäure - Prinzip der Methode	13
III.	MATERIALIEN	17
1.	Chemikalien	17
2.	Pufferlösungen	17
IV.	METHODEN	19
1.	Biologisches Material	19
1.1	Zellpräparation	19
1.1.1	Blut	19
1.1.2	Herstellung von thrombozytenreichem Plasma (TRP)	19
1.1.3	Waschen der Thrombozyten	20
1.2	Herstellung von Thrombozyten-Plasmamembranen	20
1.2.1	Herstellung lysierter Thrombozyten	20
1.2.2	Isolierung der Thrombozyten-Plasmamembran	21

Seite

2. Fluoreszenzmessungen 21
2.1 Markierung mit Pyrendecansäure 21
2.1.1 Herstellung der Pyrendecansäure-Suspension 21
2.1.2 Herstellung der Pyrendecansäure-markierten Liposomen 22
2.1.3 Markierung von Thrombozyten mit Pyrendecansäure 22
2.1.4 Markierung von Thrombozyten-Plasmamembranen mit Pyrendecansäure 23
2.1.5 Fluoreszenzspektren 24

3. Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität (EC 4.6.1.1) 24
3.1 Adenylatcyclasetest mit Thrombozyten 24
3.2 Adenylatcyclasetest mit Membranen 25

4. Bindung von ^{3}H-PGE_1 an Thrombozyten-Plasmamembranen 25
4.1 Bestimmung der Bindung in Abhängigkeit von der ^{3}H-PGE_1-Konzentration 25
4.2 Inhibierung der Bindung von ^{3}H-PGE_1 durch PGE_1 und PGF_2 26

5. Rückgewinnung von PGE_1 nach Inkubation mit den Thrombozyten 26
5.1 Inkubation der Thrombozyten-Suspension mit PGE_1 26
5.2 Extraktion der Lipide 27
5.3 Abtrennung des PGE_1 durch Kieselgel-Säulenchromatographie 27
5.4 Identifizierung der getrennten Substanzen durch Dünnschicht-Chromatographie 27

6. Transmissions-Elektronenmikroskopie 28

V. ERGEBNISSE 29

1. Biologisches Material 29
1.1 Einsammeln des Blutes, thrombozytenreiches Plasma, gewaschene Thrombozyten 29
1.2 Membranpräparation 31

Seite

2. Einfluß von PGE_1 auf die Membranfluidität 32

2.1 Fluoreszenzspektrum von Pyrendecansäure nach Aufnahme in die Membran 32

2.2 Änderung der Fluidität von Liposomen durch PGE_1 33

2.3 Phasenübergänge in der Thrombozytenmembran und ihre Beeinflussung durch PGE_1 34

2.4 Bestimmung des molaren Verhältnisses von PGE_1: Phospholipid bei den Fluoreszenzmessungen 38

3. Stimulierung der Adenylatcyclase durch PGE_1 38

3.1 Intakte Zellen 38

3.2 Isolierte Membranen 41

4. Bindungsstudien mit ^{3}H-PGE_1 und isolierten Thrombozytenmembranen 44

4.1 Abhängigkeit der Bindung von der Inkubationszeit und Proteinkonzentration 44

4.2 Bindung in Abhängigkeit von der ^{3}H-PGE_1-Konzentration 45

4.3 Inhibierung der Bindung von ^{3}H-PGE_1 durch PGE_1 und $PGF_{2\alpha}$ 47

5. Rückgewinnung von PGE_1 nach Inkubation mit Thrombozyten 48

VI. DISKUSSION 50

VII. ZUSAMMENFASSUNG 56

LITERATURVERZEICHNIS I - XI

Abkürzungen

cAMP	3',5'-cyclisches Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
DOPC	Dioleoyl-phosphatidylcholin
DMPC	Dimyristoyl-phosphatidylcholin
DPPC	Dipalmitoyl-phosphatidylcholin
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
IBMX	1-Methyl-3-isobutylxanthin
PGA_1, PGA_2	Prostaglandin A_1 und A_2
PGB_1, PGB_2	Prostaglandin B_1 und B_2
PGE_1, PGE_2	Prostaglandin E_1 und E_2
6-Keto-$PGF_{1\alpha}$	Prostaglandin 6-Keto-$F_{1\alpha}$
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin $F_{2\alpha}$
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

Fehlergrenzen

Bei den angegebenen Fehlergrenzen der Meßwerte handelt es sich um den mittleren Fehler des Mittelwertes (Küster et al. 1962).

I. EINLEITUNG

Der Einfluß der Lipid-Zusammensetzung und der Fluidität (reziproker Wert der Viskosität) der Zellmembran auf die Aktivität membrangebundener Enzyme, insbesondere der Adenylatcyclase, ist in den letzten Jahren intensiv untersucht worden (Pohl et al. 1971; Rodbell et al. 1971; Rubalcava und Rodbell 1973; Cuatrecasas 1974; Kimmelberg und Papahadjopoulos 1974; Puchwein et al. 1974; Warren et al. 1974; Orly und Schramm 1975; Hesketh et al. 1976; Houslay et al. 1976; Engelhard et al. 1978).

Als Mechanismus der Signalübertragung zwischen dem hormonstimulierten ß-adrenergen Rezeptor und der Adenylatcyclase wurde kürzlich das "Kollisions-Kopplungs-Modell" postuliert (Tolkovski und Levitzki 1978; Hanski et al. 1979). Nach dieser Hypothese sind Rezeptor und Adenylatcyclase separate Makromoleküle, die lateral frei in der Membran diffundieren können. Die Kollision eines Hormon-Rezeptor-Komplexes mit der Adenylatcyclase führt zu einer kurzzeitigen Kopplung beider Proteine und gleichzeitiger Aktivierung der Adenylatcyclase. Eine Erhöhung der Membranfluidität bei konstanter Rezeptor-Konzentration bewirkt nach diesem Modell eine proportionale Zunahme der Aktivierungsrate des Enzyms. Dieser direkte Einfluß der Membranfluidität auf die ß-adrenerge Stimulierung der Adenylatcyclase wurde durch Fluidisierung der Zellmembran mit cis-Vaccensäure experimentell demonstriert (Hanski et al. 1979).

Ein anderer wichtiger Beitrag auf diesem Gebiet war die Beobachtung, daß die Fluidisierung der Membran durch Anreicherung mit bestimmten Phospholipiden (DMPC oder DOPC) eine drastische Verringerung der ß-Rezeptor-Konzentration bewirkt (Bakardjieva et al. 1979). Das Verschwinden der Rezeptoren

kann durch ihre Aggregation, Internalisierung oder andere unbekannte Mechanismen verursacht werden. Die Adenylatcyclase-Aktivität war bei diesen Versuchen wegen der verminderten Rezeptor-Konzentration in der fluidisierten Membran geringer als in der normalen Membran. In Übereinstimmung mit dem Kollisions-Kopplungs-Modell war jedoch die Kopplungseffizienz der verbliebenen Rezeptoren durch die Fluidisierung erhöht worden.

In beiden erwähnten Untersuchungen (Hanski et al. 1979; Bakardjieva et al. 1979) wurde die Fluidisierung der Membran durch Agentien erreicht, die entweder unphysiologisch sind (cis-Vaccensäure) oder unter physiologischen Bedingungen nicht in so starkem Ausmaß variiert werden wie bei den Experimenten (Einbau von 20 - 30 % DMPC bzw. DOPC). Die vorliegende Arbeit wurde mit dem Ziel unternommen, eine körpereigene Substanz aufzufinden, deren physiologische Wirkung mit einer Änderung der Membranfluidität im Zusammenhang steht.

Prostaglandine haben starke physiologische Wirkung auf die Adenylatcyclase-Aktivität vieler Zellmembranen (Horrobin 1978). Diese Wirkung konnte bisher nicht eindeutig mit der Bindung der Prostaglandine an Membranrezeptoren korreliert werden, weil beide Vorgänge eine verschiedene Konzentrationsabhängigkeit zeigen (Lefkowitz et al. 1977; Schafer et al. 1979). Eine Wechselwirkung der Prostaglandine mit der Membran selbst ist schon aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit mit den Membranlipiden nicht unwahrscheinlich. Solche Wirkungen sind in der Literatur beschrieben: Prostaglandine erhöhen die Deformierbarkeit von Erythrozyten (Kury et al. 1974), sie penetrieren und destabilisieren künstliche Lipidfilme (Colacicco und Basu 1978).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von Prostaglandin auf Adenylatcyclase-Aktivität und Membranfluidität von Human-Thrombozyten untersucht. Bei diesem Zelltyp werden Membran-abhängige Vorgänge wie Aktivität der Adenylatcyclase und Aggregation der Zellen sehr stark durch Prostaglandin beeinflußt. Bei der physiologischen Funktion der Thrombozyten in der Blutgerinnung spielen die genannten Vorgänge eine bedeutende Rolle (Zieve und Greenough 1969; Wolfe und Shulman 1969; Marquis et al. 1969; McDonald und Stuart 1973; Lüscher et al. 1975; Crawford et al. 1977; Samuelsson et al. 1978; Marcus 1978; Burch und Majerus 1979; Nathan et al. 1979).

II. THEORETISCHER TEIL

1. Die Zellmembran

1.1 Struktur und Lipidorganisation der Membran

Die Plasmamembran der Zelle hat zunächst die Funktion einer semipermeablen Wand, welche die Aufnahme und Abgabe gelöster Substanzen durch die Zelle kontrolliert. Darüber hinaus spielt die Membran eine bedeutende Rolle bei Vorgängen wie Zellwachstum und Differenzierung. Die Regulation dieser Vorgänge geschieht durch extrazelluläre chemische Signalstoffe, von denen die Hormone eine Gruppe darstellen.

Nach dem heutigen Konzept des "flüssigen Mosaiks" hat die Membran eine fluide Struktur, die ihre Lipid- und Protein-Zusammensetzung zur Anpassung an Einflüsse der Umgebung verändern kann. Diese Vorstellung hat das Interesse an der Organisation von Lipiden und Proteinen in der Membran neu belebt. Wegen der komplexen Zusammensetzung der Plasmamembran ist das Verständnis ihrer molekularen Organisation jedoch immer noch sehr begrenzt.

Es wird allgemein als erwiesen angenommen, daß die Lipide in der Membran als Doppelschicht (Bilayer) angeordnet sind, wobei die polaren "Kopfgruppen" zur wäßrigen Umgebung ausgerichtet sind, während die lipophilen Kohlenwasserstoffketten der Fettsäurereste im Innern des Bilayers liegen (Singer und Nicolson 1972).

Bei einigen Zellen, z.B. Erythrozyten (Verkleij et al. 1973; Zwaal et al. 1973) und Thrombozyten (Chap et al. 1977) wurde gezeigt, daß die Lipide unsymmetrisch im

Bilayer verteilt sind: Phosphatidylcholin und Sphingomyelin sind überwiegend in der extracellulären Hälfte des Bilayers zu finden, während Phosphatidyläthanolamin und Phosphatidylserin sich überwiegend in der dem Cytoplasma zugewandten Hälfte befinden.

Eine sehr wichtige noch ungeklärte Frage ist, ob die Lipide in einer gegebenen Bilayer-Hälfte statistisch verteilt vorliegen, oder ob sie Bereiche mit verschiedener Phasenübergangs-Temperatur ausbilden, die als fluide bzw. quasi-kristalline Domänen bezeichnet werden. Wunderlich et al. (1975) haben postuliert, daß bei optimaler Wachstumstemperatur in der Membran von Tetrahymena pyriformis feste Domänen statistisch verteilt in einer Umgebung vorwiegend fluider Lipide vorliegen.

Die Struktur der Lipide ist für die Funktion der Membranproteine von großer Bedeutung. Von der Lipidzusammensetzung können z.B. folgende Vorgänge reguliert werden: die Diffusion von Membranproteinen (Strittmatter und Rogers 1975), die Assoziation von Membranproteinen (Grant und McConnell 1974), die Aktivität membrangebundener Enzyme (Linden et al. 1973). Auch Eigenschaften und Funktionen der Membran selbst werden durch ihre Lipidzusammensetzung reguliert, z.B.: die Permeabilität für gelöste Stoffe (Papahadjopoulos et al. 1973; van Dijck et al. 1975), die Bindung und Ablösung von Elektrolyten an der Membran-Oberfläche (Träuble und Eibl 1975) und die Fähigkeit zur Fusion mit einer anderen Membran (Papahadjopoulos et al. 1974).

In vivo kann die Membranfluidität auf verschiedene Weise reguliert werden, wie im folgenden aufgeführt wird (Jackson 1977).

(1) Erhöhung des Gehaltes an Cholesterin. Unterhalb der Phasenumwandlungs-Temperatur der Membran verursacht Cholesterin eine Fluidisierung infolge erhöhter Beweglichkeit der Kohlenwasserstoffketten der Lipide; oberhalb der Phasenumwandlungs-Temperatur bewirkt Cholesterin dagegen eine Verfestigung der Membran.

(2) Änderung der Fettsäure-Zusammensetzung der Lipide. Ungesättigte und kurzkettige Fettsäuren führen zur Fluiditätserhöhung, gesättigte und langkettige Fettsäuren hingegen zur Verfestigung der Membran.

(3) Änderung der Kopfgruppen der Lipide. Äthanolaminderivate haben höhere Phasenübergangs-Temperatur als Cholinderivate.

(4) Änderung der Ionenzusammensetzung. Ca^{++} erhöht die Phasenübergangstemperatur von Phosphatidylserin.

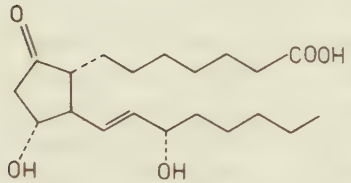
(5) Änderung der Proteinzusammensetzung.

1.2 Liposomen als Modell der Zellmembran

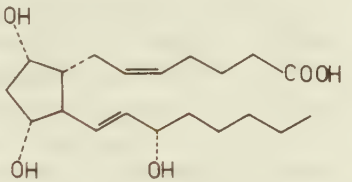
Durch Ultraschall-Behandlung eines Diphosphatidylcholin-Lipidfilms unter Wasser bilden sich sphärische Bilayerstrukturen, die als Lipidvesikel oder Liposomen bezeichnet werden. Lipidanordnung und Dicke des Bilayers entsprechen den Verhältnissen bei biologischen Membranen, die Lipidzusammensetzung kann beliebig variiert werden. Wegen dieser Eigenschaften werden Liposomen in ausgedehntem Maße als Modellsystem zum Verständnis der Struktur und Funktion natürlicher Membranen eingesetzt (Sessa et al. 1969; Galla et al. 1974; Verma et al. 1976; Sackmann et al. 1977; Hartmann et al. 1978). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde mit Hilfe von Liposomen untersucht, ob Prostaglandine mit einem Lipid-Bilayer in Wechselwirkung treten und seine Fluidität verändern.

2. Struktur und Biosynthese der Prostaglandine

Die Prostaglandine, welche durch von Euler (1936) entdeckt wurden, sind ungesättigte Fettsäuren, die einen Cyclopentanring mit 2 aliphatischen Seitenketten sowie Hydroxy- und Ketogruppe(n) enthalten. Die Strukturformeln der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Prostaglandine PGE_1 und $PGF_{2\alpha}$ sind nachstehend wiedergegeben. Prostaglandine der Typen 1, 2 und 3 besitzen 1, 2 und 3 Doppelbindungen.



PGE_1



$PGF_{2\alpha}$

Prostaglandine werden anscheinend von allen Säugetierzellen gebildet; eine Ausnahme sind vielleicht reife Erythrozyten. Sie sind im Tierreich weit verbreitet und spielen bei den meisten Lebewesen vielleicht eine ähnlich fundamentale Rolle als Regulationsstoffe wie Ca^{++} und cyclische Nucleotide (Horrobin 1978). Normalerweise werden sie nicht im Gewebe gespeichert, sondern nach Maßgabe ihres Bedarfs synthetisiert (Ramwell et al. 1966; Piper und Vane 1971).

Wie in Fig. 1 gezeigt ist, werden die Prostaglandine biosynthetisch aus einkettigen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren gebildet. Im tierischen Gewebe findet sich als mengenmäßig bedeutendste Vorstufe Arachidonsäure, jedoch kommt auch Dihomogammalinolensäure in beträcht-

lichem Ausmaß vor (Danon et al. 1975; Falardeau et al. 1976; Stone et al. 1979). Arachidonsäure kommt in der Zellmembran fast nur gebunden in Phospholipiden und Triglyceriden vor. Nur die freie Arachidonsäure kann jedoch zu Prostaglandin umgewandelt werden (Lands und Samuelsson 1968; Vonkeman und van Dorp 1968). Die Freisetzung der gebundenen Arachidonsäure wird durch Phospholipasen katalysiert; dies ist anscheinend der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Prostaglandin-Biosynthese (Samuelsson 1970).

Die freie Arachidonsäure wird durch das Enzym Prostaglandin-Endoperoxid-Synthetase sehr rasch in Prostaglandin-Endoperoxide umgewandelt (Hamberg und Samuelsson 1973; Nugteren und Hazelhof 1973; Miyamoto et al. 1976; van der Ouderra et al. 1977). Diese sind nach allgemeiner Ansicht direkte Vorstufen sowohl der "klassischen" Prostaglandine der Serien D, E und F (Hamberg und Samuelsson 1973; Nugteren und Hazelhof 1973) als auch der chemisch verwandten Thromboxane (Hamberg et al. 1975) sowie des Prostacyclins (Gryglewski et al. 1976; Moncada et al. 1976). Die Enzyme und Kofaktoren der Synthese und Metabolisierung der Prostaglandin-Endoperoxide sind in den einzelnen Zelltypen und Geweben in unterschiedlichem Maße vorhanden. Die qualitative und quantitative Ausprägung der Prostaglandin-Synthese ist daher gewebsspezifisch (Pace-Asciak 1977; Pace-Asciak et al. 1977), woraus eine beträchtliche biologische Flexibilität im Prostaglandin-System resultiert.

Die Prostaglandine werden im Gewebe rasch weiter metabolisiert; ihre Wirkung ist daher von kurzer Dauer und dementsprechend auf die unmittelbare Umgebung ihres Bildungsortes beschränkt.

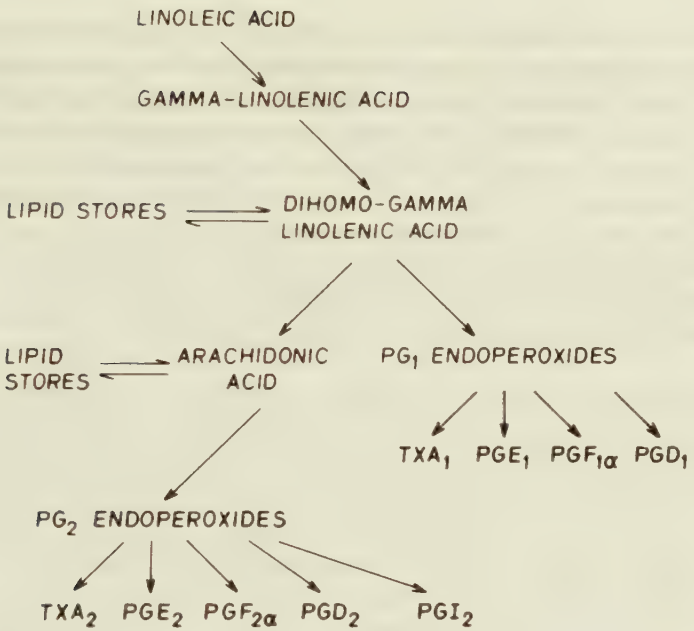


Fig. 1: Schema der Biosynthese der Prostaglandine (PG) und Thromboxane (TX) (aus Horrobin 1978)

3. Thrombozyten als Testsystem

3.1 Morphologie und Physiologie

Die folgende Kurzdarstellung basiert auf: Cooper et al. (1976); Biochemistry and Pharmacology of Platelets (1975); Platelets in Biology and Pathology (1976); Platelets: A Multidisciplinary Approach (1978).

Die im Blut frei zirkulierenden Thrombozyten spielen eine wesentliche Rolle bei der Blutgerinnung. Ihre Konzentration im Plasma beträgt normalerweise 3×10^5 Zel-

len/mm^3, ihre Lebensdauer 7 - 10 Tage. Sie sind die kleinsten Blutzellen (Durchmesser 2 µm), besitzen Scheibenform und sind kernlos. Ihr Metabolismus ist komplex und ähnelt dem anderer Zellen. Die Struktur der Thrombozytenmembran ist morphologisch von der anderer Zellmembranen nicht zu unterscheiden, ihre Dicke beträgt 70 - 90 Å. Das Verhältnis von Protein : Phospholipid in der Thrombozytenmembran beträgt 10 : 7 (w/w). Die Membran hat als interessante Eigenschaft eine asymmetrische Verteilung der Phospholipide zwischen beiden Hälften des Bilayers.

Sobald Thrombozyten im zirkulierenden Blut an eine Stelle gelangen, an der das Endothel beschädigt oder ein Blutgefäß aufgerissen ist, werden sie infolge des Kontaktes mit Kollagen oder anderen subendothelialen Substanzen aktiviert und heften sich dort an. Anschließend aggregieren an dieser Stelle weitere Thrombozyten und bilden einen Pfropf, auf dem sich schließlich der Thrombus manifestiert. Die Anheftung der Thrombozyten an der beschädigten Oberfläche ist jedoch nicht der alleinige Grund für das Anwachsen des Pfropfes, denn die meisten der aggregierenden Zellen kommen mit dieser Oberfläche gar nicht in Kontakt. Bei der Anheftung bzw. der Aggregation sezernieren die Thrombozyten den Inhalt intrazellulärer Granula; dieser Vorgang wird "Release-Reaktion" genannt. Die ausgeschütteten Substanzen aktivieren kaskadenartig andere Thrombozyten. Der ganze Prozeß der Aktivierung und Aggregation kann dadurch innerhalb von Sekunden ablaufen.

Die Plasmamembran der Thrombozyten enthält mehrere funktionell spezifische Proteine, welche bei der Aktivierung der Zellen mitwirken. Substanzen von biochemisch sehr verschiedener Herkunft können die Aktivierung und Aggregation auslösen, z.B. ADP, Thrombin, Immunkomplexe, Adrenalin, Serotonin, Vasopressin, Lipide. Die Reaktion

der Thrombozyten auf diese verschiedenen Stimuli besteht immer in derselben Folge von Ereignissen: zunächst eine Formveränderung von scheibenförmig zu sphärisch, dann Aggregation und "Release-Reaktion".

3.2 Thrombozyten und Membranfluidität

Forschungsergebnisse der letzten Jahre haben gezeigt, daß Änderungen der Membranfluidität die Funktion der Thrombozyten stark beeinflussen (Shattil et al. 1975; Shattil und Cooper 1976; Sinha et al. 1977; Shattil et al. 1978; Nathan et al. 1979). Durch Anreicherung der Thrombozytenmembran mit Cholesterin in vitro wird die Membranfluidität verringert und die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber einem Aggregations-Stimulus durch ADP und Adrenalin gesteigert (Shattil et al. 1975). Die Fluiditätsabnahme hat auch eine Wirkung auf die Adenylatcyclase-Aktivierung: Cholesterin-angereicherte Thrombozyten werden durch PGE_1 oder NaF nicht stimuliert (Sinha et al. 1977).

Ein in vivo erhöhter Cholesteringehalt der Thrombozyten wurde bei Patienten mit Hyperlipoproteinämie des Typs IIa gefunden (Carvalho et al. 1974; Colman 1978).

3.3 Die Rolle der Prostaglandine bei der Funktion der Thrombozyten

Bereits vor längerer Zeit war gezeigt worden, daß nach Zugabe von PGE_1 die Auslösung der Aggregations- und Release-Reaktionen bei Thrombozyten verhindert wird (Kloeze 1967). Nach neueren Untersuchungen könnte die Wirkung des PGE_1 durch Stimulierung der Adenylatcyclase vermittelt werden (Wolfe und Shulman 1969; Marquis et al. 1969; Harwood et al. 1972; Salzman und Weisenberger 1972; Smith und Macfarlane 1974). Es ist jedoch nicht

klar, ob cAMP ein direkter Inhibitor der Wirkung aggregationsauslösender Agentien auf Thrombozyten ist (Ball et al. 1970; Mills und Smith 1971; McDonald und Stuart 1973; Wang et al. 1977).

Im Gegensatz zu diesen Befunden war gezeigt worden, daß Agentien, welche die Aggregation der Zellen auslösen, auch die Synthese der Prostaglandine E und F in Thrombozyten stimulieren (Smith und Willis 1970). Mehrere Autoren postulierten dann, daß die Aggregations- und Release-Reaktionen durch Prostaglandine stimuliert werden. Diese Hypothese war jedoch schwierig aufrechtzuerhalten, weil die zu jener Zeit bekannten "klassischen" Prostaglandine bei Thrombozyten keine Aggregation auslösen.

Das Problem wurde erst gelöst, nachdem der Metabolismus der Arachidonsäure in Thrombozyten und in der Gefäßwand im Laufe der letzten Jahre aufgeklärt worden war. Als hauptsächliche Umwandlungsprodukte der Säure in Thrombozyten wurden cyclische Endoperoxide (Hamberg et al. 1974) und Thromboxan A_2 (Hamberg et al. 1975) gefunden; beide fördern die Thrombozyten-Aggregation. In der Wand der Blutgefäße wurde als wichtiger Metabolit der Arachidonsäure Prostacyclin (PGI_2) entdeckt (Gryglewski et al. 1976; Moncada et al. 1976). Dieses ist ein Inhibitor der Thrombozyten-Aggregation und gleichzeitig ein starker Stimulator der Adenylatcyclase dieser Zellen (Gorman et al. 1977; Tatenson et al. 1977). Durch diese neuen Entdeckungen ist geklärt worden, welche Rolle die einzelnen Arachidonsäure-Metaboliten für die Thrombozyten-Funktion bei der Blutgerinnung und für die Wechselwirkungen der Thrombozyten mit der Gefäßwand spielen (Moncada und Vane 1979).

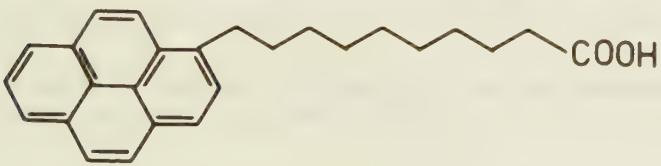
3.4 PGE_1 als Modellsubstanz

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nur Einflüsse von Prostaglandin auf die Adenylatcyclase und die Membranfluidität untersucht. Wirkungen auf die Thrombozyten-Aggregation, wie z.B. Inhibierung durch Prostacyclin oder PGE_1, wurden nicht untersucht. In neueren Arbeiten wurde jedoch gezeigt, daß Prostacyclin und PGE_1 gemeinsame Merkmale in ihrer Wirkung auf Thrombozyten haben. Bei der Aktivierung der Adenylatcyclase wirken beide Substanzen über den gleichen Rezeptor (Marcus 1978; Burch und Majerus 1979; Siegel et al. 1979; Miller und Gorman 1979; Schafer et al. 1979). Prostacyclin ist in wäßriger Lösung bei neutralem pH-Wert instabil; es wird mit einer Halbwertszeit von 3 - 7 Min. zu 6-Keto-$PGF_{1\alpha}$ hydrolysiert, welches biologisch inaktiv ist (Armstrong et al. 1978; Cho und Allen 1978). Unter anderem wegen der Instabilität des Prostacyclins wurde als Modellsubstanz PGE_1 gewählt, welches in Wasser bei pH 6 - 7 stabil ist (Informationsschrift der Fa. Upjohn: Properties of Prostaglandins and Prostaglandin Solutions).

4. Messung von Fluiditätsänderungen der Membran mit Hilfe von Pyrendecansäure als Fluoreszenzmarker - Prinzip der Methode

(Galla und Sackmann 1974; Hartmann und Galla 1978)

Pyrendecansäure kann mit ihrem lipophilen Molekülteil leicht in künstliche und natürliche Membranen eindringen und lateral darin diffundieren.



In der Membran bildet Pyrendecansäure angeregte Komplexe (Excimere) aus einem Molekül im Grundzustand und einem angeregten Molekül:

$$P^* + P \rightleftharpoons (PP^*)$$

P* ist das angeregte Monomer und (PP*) das Excimer. Die Bildung des Excimers wird angezeigt durch das Auftreten einer breiten Fluoreszenzbande (maximale Intensität I' bei 475 nm), die von den Fluoreszenzbanden des Monomers (maximale Intensität I bei 395 nm) deutlich getrennt ist (Fig. 5). Die Geschwindigkeit der Komplexbildung ist gleich dem Produkt der Geschwindigkeitskonstanten 2. Ordnung, k_a, und der Konzentration des Markers pro Flächeneinheit, c. Sie ist proportional zu dem Quotienten der Fluoreszenzintensitäten des Monomers und des Excimers:

$$I'/I = K \cdot k_a \cdot c$$

In fluiden Membranen ist die Komplexbildung ein diffusionskontrollierter Vorgang, und das Produkt $k_a \cdot c$ ist ein direktes Maß für die Kollisionsrate, ν_c; ($k_a \cdot c = \nu_c$). Die Löslichkeit des Markers in quasi-kristallinen Regionen der Membran ist äußerst gering.

Man mißt die Fluoreszenz von Pyrendecansäure in einer Membransuspension über einen größeren Bereich ansteigender Temperatur. Nach Auftragung von I'/I gegen die Temperatur erhält man eine Kurve, aus der Phasenübergänge der Membran ablesbar sind. Die Auswertung der Kurve soll an zwei Beispielen von Messungen mit Liposomen erläutert werden (Fig. 2) (Sackmann et al. 1977).

Liposomen, die zu 100 % aus DOPC bestehen, haben eine Phasenübergangstemperatur (Übergang vom quasi-kristal-

linen zum fluiden Zustand) von -22°C. Im Temperaturbereich der Messung (10° - 60°C) liegt die Membran also bereits im fluiden Zustand vor. Man beobachtet einen linearen Anstieg von I'/I über den ganzen Temperaturbereich, der durch die Viskositätsabnahme der fluiden Membran mit der Temperatur verursacht wird.

Liposomen aus je 50 % DOPC und DPPC haben im gemessenen Temperaturbereich einen Phasenübergang. Bei tiefen Temperaturen (10° - 20°C) liegen in der Membran quasi-kristalline Regionen (überwiegend DPPC) neben fluiden Regionen (überwiegend DOPC) vor. Pyrendecansäure befindet sich aufgrund ihrer Löslichkeit fast ausschließlich in den fluiden Regionen, und I'/I steigt infolge der Viskositätsabnahme dieser Regionen mit der Temperatur an. Im mittleren Temperaturbereich (20° - 34°C) schmelzen die quasi-kristallinen Bereiche. Die Pyrendecansäure verteilt sich nun auf eine größere Menge fluider Lipide, d.h. ihre Konzentration c verringert sich mit zunehmender Temperatur. Deshalb beobachtet man in diesem Bereich eine wesentlich geringere Zunahme von I'/I mit der Temperatur. Sobald bei weiterer Temperaturerhöhung (> 34°C) alle quasi-kristallinen Lipidregionen geschmolzen sind, zeigt I'/I wieder eine ähnlich große, lineare Zunahme mit der Temperatur wie im unteren Bereich. Aus der Auftragung von I'/I gegen die Temperatur kann man also Anfangs- und Endtemperatur der Phasenumwandlung ermitteln.

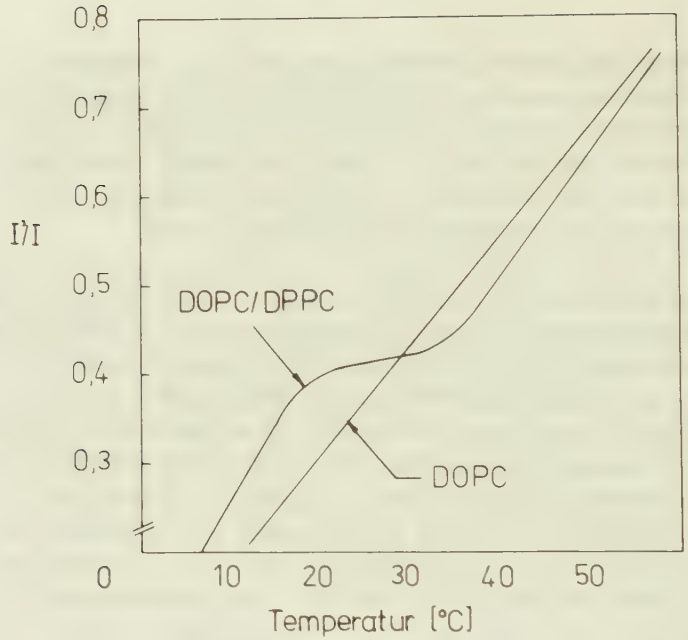


Fig. 2: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I'/I von Pyrendecansäure in Liposomen als Funktion der Temperatur. Die Liposomen bestehen aus 100 % DOPC bzw. 50 % DOPC / 50 % DPPC (mol : mol). Aus Sackmann et al. 1977.

Bei biologischen Membranen können Phasenübergangs-Temperaturen in prinzipiell gleicher Weise ermittelt werden. Aufgrund der komplexen Lipid- und Proteinzusammensetzung sind bei Auftragung von I'/I gegen die Temperatur mehrere Unstetigkeiten zu erwarten. Eine Abnahme der Steigung kann jeweils als Beginn eines Schmelzvorgangs, eine Zunahme der Steigung als Ende eines Schmelzvorgangs interpretiert werden. Die praktische Auswertung wird anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschrieben.

III. MATERIALIEN

1. Chemikalien

Pyrendecansäure war ein Geschenk von Dr. H.-J. Galla, Universität Ulm. PGE_1 = 11α, 15(S)-Dihydroxy-9-keto-prosta-13(trans)-ensäure, $PGF_{2\alpha}$ = 9α,15(S)-Trihydroxy-prosta-5,13-diensäure waren Geschenke von Dr. J. Pike, Upjohn Comp., Kalamazoo, Michigan, USA.
Die folgenden Substanzen wurden von den in Klammern genannten Firmen bezogen. ^{3}H-PGE_1, spezif. Aktivität 56 Ci/mmol, radiochemische Reinheit 99 % (Amersham-Buchler, Braunschweig; TRK 426). ^{3}H-cAMP, spezif. Aktivität 27 Ci/mmol (TRK 304; Amersham-Buchler, Braunschweig). Dowex-Kationenaustauscher 50 W-X 8, 100-200 mesh, H^+-Form (Bio-Rad Laboratories, München). 1-Methyl-3-isobutylxanthin (Aldrich-Europe, Nettetal). Kreatinphosphat, Kreatinkinase, ATP (Boehringer, Mannheim). Kieselgel SIL-R, 100-300 mesh (Sigma, Taufkirchen). Glutardialdehyd, Rotiszint 22 (Roth, Karlsruhe). Araldit (Fluka, Neu-Ulm). Alle anderen Reagenzien wurden in analytischem Reinheitsgrad von Merck, Darmstadt, bezogen.

2. Pufferlösungen

PBS-Puffer (Calcium free phosphate buffered saline, pH 7,4, with 5,5 mM glucose, 306 mOs): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na_2HPO_4, 1,5 mM KH_2PO_4, 0,5 mM $MgCl_2$, 5,5 mM D(+) Glucose. pH 7,4 bei 25^{o}C. Temperaturkoeffizient -0,0028 pH-Einheiten pro ^{o}C (Handbook of Chemistry and Physics).

NTE-Puffer: 150 mM NaCl, 150 mM Tris-HCl pH 7,4 bei $4^{o}C$ und 77 mM Dinatrium-EDTA werden im Volumenverhältnis 90 : 8 : 2 gemischt (Haslam 1964).

Boratpuffer: 50 mM $Na_2B_4O_7$, 200 mM H_3BO_3 und Wasser werden im Volumenverhältnis 20,6 : 18,4 : 61 gemischt. pH 7,8 bei $25^{o}C$. Temperaturkoeffizient -0,0082 pH-Einheiten pro ^{o}C (Handbook of Chemistry and Physics).

Lysepuffer: 5 mM Dinatrium-EDTA, 5 mM Tris-HCl, pH 7,4 bei $4^{o}C$.

IV. METHODEN

1. Biologisches Material

1.1 Zellpräparation

1.1.1 Blut (Haslam 1964)

Blut von gesunden, nüchternen Spendern (beide Geschlechter, 20 - 40 Jahre alt), die zwei Wochen vorher keinerlei Arzneimittel eingenommen hatten, wurde von der Blutbank des Bayrischen Roten Kreuzes, Würzburg, erhalten. Jeweils 46,25 ml Blut wurden in Plastikröhren (Corning 50 ml Centrifuge Tube with Screw Cap) gesammelt, die je 3,75 ml 0,077 M Dinatrium-EDTA enthielten, und sorgfältig mit dem Antikoagulans gemischt.

1.1.2 Herstellung von thrombozytenreichem Plasma (TRP) (Woods et al. 1976; Wolfe und Shulman 1969)

Diese Präparation wurde 10 min. nach Einsammeln des Blutes begonnen. Das Blut wurde in einem Ausschwingrotor 12 min. (t) zentrifugiert. Die Zentrifugalbeschleunigung betrug 220 x g, berechnet für die Mitte der Blutschicht, d.h. g x t = 2640. Nach der Zentrifugation wurden die Röhren vorsichtig entnommen und 5 min. stehengelassen. Mit einer Plastikpipette wurde das Plasma bis auf die untersten 0,5 cm der Schicht entnommen, in eine frische Zentrifugenröhre überführt und in Eis gekühlt. Um die Ausbeute an Thrombozyten zu erhöhen, wurde das aus Erythrozyten und Leukozyten bestehende Pellet mit NTE-Puffer auf 50 ml suspendiert und wie beschrieben zentrifugiert und abpipettiert. Beide Plasmafraktionen wurden vereinigt und bis zum nächsten Schritt auf Eis gekühlt. Das so gewonnene TRP wurde noch einmal bei 220 x g 12 min. zentrifugiert, um Spuren von Erythrozyten und Leukozyten zu entfernen. Da das resultierende

Pellet neben den verunreinigenden Zellen viele Thrombozyten enthielt, wurde es zweimal mit 50 ml NTE-Puffer wie beschrieben gewaschen und die Überstände wie TRP weiter verarbeitet.

1.1.3 Waschen der Thrombozyten (Haslam 1964; Hamberg et al. 1974)

Das TRP wurde bei 4^{o}C 10 min. mit 900 x g zentrifugiert (Sorvall RC2-B-Zentrifuge, Rotor SS-34, 50 ml-Plastikröhren). Die Thrombozyten-Pellets wurden in 3 ml NTE-Puffer suspendiert, vereinigt, auf 40 ml verdünnt und erneut zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in PBS-Puffer bzw. Lysepuffer (je nach Präparationsziel) suspendiert.
Wenn die gewaschenen Thrombozyten bei einer Konzentration von 0,3 - 0,4 x 10^{9}/ml in PBS 10 min. bei 37^{o}C inkubiert wurden, zeigten sie typisches "swirling" (Wang et al. 1977).
Die so erhaltenen Präparationen von TRP und gewaschenen Thrombozyten wurden mit Hilfe einer Bürker-Kammer und eines Coulter Counters (Modell C) gezählt. Dabei wurde ein Gehalt von <10 Erythrozyten und <1 Leukozyten pro 10^{5} Thrombozyten gefunden.

1.2 Herstellung von Thrombozyten-Plasmamembranen

1.2.1 Herstellung lysierter Thrombozyten (Tsai und Lefkowitz 1978; Marcus et al. 1966)

10 - 15 x 10^{9} gewaschene Thrombozyten wurden in 15 ml Lysepuffer bei 4^{o}C 1 min. inkubiert. Das Lysat wurde in einen vorgekühlten Glas-Homogenisator überführt und homogenisiert, indem ein Teflon-Pistill zum Zeitpunkt 0, 5 und 10 Minuten je 20 mal gestoßen wurde. Das Homogenat wurde mit Lysepuffer auf 40 ml verdünnt und bei 4^{o}C 10 min. mit 40.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde einmal mit

Lysepuffer und einmal mit PBS-Puffer gewaschen und schließlich in 2,5 ml PBS-Puffer suspendiert.

1.2.2 Isolierung der Thrombozyten-Plasmamembran (Day et al. 1969; Marcus et al. 1966)

Lysierte Thrombozyten aus 100 ml Blut ($10 - 15 \times 10^9$ Thrombozyten), die in 2,5 ml PBS-Puffer suspendiert waren, wurden auf 32,5 ml eines Sucrosegradienten (20 - 60 % Sucrose in 1 mM Dinatrium-EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, in Beckman Polyallomer-Röhre 3,5 x 1 inch) bei $4^{\circ}C$ aufgetragen und 90 min bei 136.000 x g zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckman L5-50). Man erhielt zwei partikuläre Banden, eine breite bei einer Dichte von 1,17 - 1,21 g/ml, die granuläres Material, Mitochondrien und große Membranfragmente enthielt, und eine schmale bei einer Dichte von 1,10 - 1,13 g/ml, die Plasmamembran-Vesikel enthielt. Die Bande bei 1,10 - 1,13 g/ml wurde mit einer Pasteur-Pipette entnommen, mit PBS-Puffer auf 40 ml verdünnt, bei $4^{\circ}C$ 10 min. bei 40.000 x g zentrifugiert und einmal mit dem gleichen Puffer gewaschen. Nach Proteinbestimmung (Lowry et al. 1951) wurde die Membransuspension auf eine Konzentration von 2 - 4 mg Protein/ml eingestellt und in 1 ml-Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Reinheit der Membranpräparation wurde elektronenmikroskopisch geprüft.

2. Fluoreszenzmessungen

2.1 Markierung mit Pyrendecansäure

2.1.1 Herstellung der Pyrendecansäure-Suspension

Stammlösungen von 1 mM Pyrendecansäure wurden in absolutem Äthanol bereitet und bei $4^{\circ}C$ aufbewahrt. 200 µl dieser Lösung wurden mit Stickstoff eingetrocknet. 1 ml PBS-Puffer (für Experimente mit Zellen) bzw. Borat-

puffer (für Experimente mit Membranen) wurde zugegeben. Durch Anwendung von Ultraschall (20 kHz, 5 min. unter Stickstoff-Atmosphäre) wurde der Pyrendecansäurefilm im Puffer suspendiert.

2.1.2 Herstellung von Pyrendecansäure-markierten Liposomen

Liposomen wurden nach der Methode von Martin und McDonald (1976) hergestellt. Mischungen von DOPC, DPPC und Pyrendecansäure im molaren Verhältnis von 53 : 44 : 3 wurden in Chloroform gelöst und mit Stickstoff eingetrocknet. Zu dem Lipidfilm wurden 10 ml Boratpuffer gegeben. Die Endkonzentration der Lipide betrug 8×10^{-4}M. Die Mischung wurde bei 42°C (oberhalb der Phasenübergangstemperatur der Lipide) 5 min. unter Stickstoff-Atmosphäre mit Ultraschall von 20 kHz behandelt. Die auf diese Weise hergestellte Liposomensuspension wurde geteilt (2 x 5 ml). Zur einen Hälfte wurde in Äthanol gelöstes PGE_1 (Endkonzentration 8×10^{-6}M) gegeben, zur anderen Hälfte die entsprechende Menge Äthanol. Beide Suspensionen wurden noch 1 min. bei Zimmertemperatur wie beschrieben mit Ultraschall behandelt und dann zu Fluoreszenzmessungen im Temperaturbereich von 11 - 40°C verwendet.

2.2.3 Markierung von Thrombozyten mit Pyrendecansäure

Ca. 3 ml Thrombozyten-Suspension ($0,3 - 0,4 \times 10^9$ Zellen/ml) wurden mit 1 ml Pyrendecansäure-Suspension 60 min. bei 30°C unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Dann wurde die Probe mit PBS-Puffer auf 10 ml verdünnt und 10 min. bei 900 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS-Puffer suspendiert und erneut zentrifugiert. Die markierten Zellen wurden abschließend in 3 ml PBS-Puffer suspendiert. Bei Experimenten mit PGE_1 wurden die Zellen vor der Markierung mit Pyrendecansäure wie folgt behandelt: Ca. 10^9 Zellen wurden 10 min.

bei 37°C mit 10 µM PGE_1 inkubiert, mit PBS-Puffer auf 10 ml verdünnt und 10 min. bei 900 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml PBS-Puffer suspendiert und rezentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 3 ml PBS-Puffer suspendiert und wie oben beschrieben mit Pyrendecansäure markiert. Die Lösung von PGE_1 wurde hergestellt, indem äthanolische PGE_1-Stammlösung (1 mg/ml) mit Stickstoff eingetrocknet und der Rückstand in PBS-Puffer gelöst wurde.

2.1.4 Markierung von Thrombozyten-Plasmamembranen mit Pyrendecansäure

1 mg Thrombozyten-Plasmamembranen wurde mit Boratpuffer auf 3 ml gebracht und mit 1 ml Pyrendecansäure-Suspension 10 min. bei 37°C unter gelegentlichem Umschütteln inkubiert. Die Probe wurde mit Boratpuffer auf 10 ml verdünnt und 10 min. bei 40.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Boratpuffer suspendiert und rezentrifugiert. Die markierten Membranen wurden in 3 ml Boratpuffer suspendiert.

Bei Experimenten mit PGE_1 wurden die Membranen vor der Markierung mit PGE_1 wie folgt behandelt: 1 mg Membranen wurde in 3 ml Boratpuffer suspendiert und 10 min. bei 37°C mit 10 µM PGE_1 inkubiert, mit Boratpuffer auf 10 ml verdünnt und 10 min. bei 40.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml Boratpuffer suspendiert, rezentrifugiert und abschließend in 3 ml Boratpuffer suspendiert.

Bei einigen Experimenten wurden die Membranen zuerst mit Pyrendecansäure markiert und dann mit PGE_1 inkubiert. Nach dieser Behandlung in umgekehrter Reihenfolge wurde kein Unterschied bei den gemessenen Fluoreszenzdaten festgestellt.

Zur Bestimmung der von den Membranen gebundenen Menge PGE_1 wurde ^3H-PGE_1 verwendet. Dieses wurde der alkoho-

lischen Stammlösung von PGE_1 zugesetzt, bevor sie mit Stickstoff eingetrocknet und in Boratpuffer aufgenommen wurde. Das molare Verhältnis Phospholipid : PGE_1 wurde aufgrund der Proteinbestimmung errechnet, da das Verhältnis Protein : Phospholipid in den Membranen bekannt ist.

2.1.5 Fluoreszenzspektren

Bei den Messungen wurde ein Spektralfluorometer (Schoeffel RRS 1000) mit Registrierung (Rika Denki BW 100) verwendet. Nach Markierung des biologischen Materials mit Pyrendecansäure wurden im Temperaturbereich von 15 - 45°C Fluoreszenz-Emissionsspektren der Suspension zwischen 350 nm und 500 nm mit Exzitation bei 320 nm aufgenommen.

3. Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität (EC 4.6.1.1)

3.1 Adenylatcyclasetest mit Thrombozyten

Thrombozyten-Suspension in PBS-Puffer ($0,2 - 0,4 \times 10^9$ Zellen/ml) wurde mit 1 mM 1-Methyl-3-isobutylxanthin 1 min. vorinkubiert und anschließend mit PGE_1 über bestimmte Zeiten stimuliert. Das Probenvolumen betrug stets 1 ml. Nach der Stimulierung wurden die Proben sofort durch Zugabe von 1 ml 0,6 M Perchlorsäure ausgefällt. Zur Bestimmung der Rückgewinnung von cAMP wurden 7000 cpm ^{3}H-cAMP zu jeder Probe gegeben und diese bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben 10 min. bei 1.400 x g und 4°C zentrifugiert, das Pellet einmal mit 1 ml 0,1 N HCl gewaschen und die beiden Überstände vereinigt. Das cAMP wurde durch Chromatographie der Überstände an Säulen (0,6 x 10 cm) mit Dowex-Ionenaustauscher (Typ 50 W-X 8, 100-200 mesh, H^+-Form, hergestellt nach Schultz et al. 1974) gereinigt. Nach Aufgeben der 2 ml-Probe wurde das cAMP mit 0,1 N HCl eluiert (Elutionsvolumen

13 ml bis 40 ml). Die gesammelten Fraktionen wurden lyophilisiert und in 300 µl Wasser gelöst. cAMP wurde nach der Methode von Gilman (1970) bestimmt, cAMP-bindendes Protein wurde nach Gilman (1970) präpariert. Die Rückgewinnung von cAMP betrug 70 - 75 %.

Für die Messung der Adenylatcyclase-Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur war PBS-Puffer geeignet, da sein pH-Wert sehr wenig temperaturabhängig ist.

3.2 Adenylatcyclasetest mit Membranen

Die Testmischung enthielt 25 mM Tris-HCl, 1,5 mM ATP, 8 mM $MgCl_2$, 1 mM 1-Methyl-3-isobutylxanthin, 10 mM Kreatinphosphat, 0,1 mg Kreatinkinase (25 U/mg), pH 7,4 bei 37°C und 60 - 70 µg Membranprotein in einem Volumen von 230 µl. Die enzymatische Reaktion wurde gestoppt durch 2 min. Erhitzen der Probe auf 100°C, präzipitiertes Protein wurde durch Zentrifugation entfernt und cAMP wurde nach der Methode von Gilman (1970) bestimmt. Bei der Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität wurde die Testmischung bei jeder Temperatur auf pH 7,4 eingestellt. Die cAMP-Bildung war bei 8 - 16°C linear mit der Zeit bis 40 min., bei 17 - 40°C linear mit der Zeit bis 10 min. Unter den Testbedingungen war die cAMP-Bildung proportional zur Proteinkonzentration. Alle Adenylatcyclase-Bestimmungen wurden mit Duplikat-Proben ausgeführt.

4. Bindung von ^{3}H-PGE_1 an Thrombozyten-Plasmamembranen

4.1 Bestimmung der Bindung in Abhängigkeit von der ^{3}H-PGE_1-Konzentration (Brunton et al. 1976)

Proben mit etwa 500 µg Membranprotein wurden mit ^{3}H-PGE_1 in einem Puffer mit 50 mM Tris-HCl und 1 mM $MgCl_2$, pH 7,5, 10 min. bei 37°C inkubiert. Das Probenvolumen war 350 µl, die ^{3}H-PGE_1-Konzentration variierte zwischen

4,5 und 150 nM. Die unspezifische Bindung wurde in Gegenwart eines Überschusses von nicht radioaktivem PGE_1 ($3,8 \times 10^{-5}$M) bestimmt. Nach der Inkubation wurden von jeder Probe drei 100 µl-Aliquote entnommen und auf 200 µl 10 % Sucrose in 50 mM Tris-HCl, 1 mM $MgCl_2$, pH 7,5, in Plastikröhrchen (4 x 45 mm) überschichtet. Die Röhrchen wurden 5 min. bei 27.000 x g und 4°C zentrifugiert (Sorvall RC2-B-Zentrifuge, Ausschwingrotor HB4). Der Überstand wurde abgesaugt, das Röhrchen ohne Aufrühren des Pellets mit 400 µl Puffer gewaschen und abgesaugt. Der Boden des Röhrchens mit dem Pellet wurde abgeschnitten, in ein Scintillationsgefäß überführt und eine Stunde mit Triton-Toluol-Scintillationsmischung (Roth, Rotiszint 22) geschüttelt. Radioaktivität wurde mit 50 % Zählausbeute gemessen, der Mittelwert der Dreifach-Bestimmungen wurde ausgewertet.

4.2 Inhibierung der ^{3}H-PGE_1-Bindung durch PGE_1 und $PGF_{2\alpha}$

Die Bindung von 90 nM ^{3}H-PGE_1 wurde in Gegenwart von 3 nM bis 100 µM nicht radioaktivem Prostaglandin wie oben angegeben bestimmt.

5. Rückgewinnung von PGE_1 nach Inkubation mit den Thrombozyten

5.1 Inkubation der Thrombozyten-Suspension mit PGE_1

20 ml gewaschene Thrombozyten wurden mit PBS-Puffer auf eine Konzentration von $0,8 \times 10^9$ Zellen/ml gebracht und 5 min. bei 30°C inkubiert. Dann wurden 10 µM PGE_1 zusammen mit ^{3}H-PGE_1 zugegeben und 10 min. bei 30°C inkubiert. Während der Inkubationen wurde die Thrombozyten-Suspension mit einem Magnetrührer bei 350 U/min. gerührt. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 20 ml eiskaltem Puffer beendet, die weitere Bearbeitung erfolgte bei 4°C. Die Probe wurde 10 min. bei 900 x g zentrifugiert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Dann wurden die Thrombozyten in

20 ml Puffer suspendiert und eine 200 µl-Probe zur Radioaktivitäts-Zählung entnommen.

5.2 Extraktion der Lipide (Lagarde et al. 1979)

Die Thrombozyten-Suspension nach 5.1 wurde mit 3 Volumina Äthanol von -20°C kräftig geschüttelt. Die Äthanol-Wasser-Mischung wurde mit 0,5 M Citronensäure auf pH 3,55 eingestellt und einmal mit 6 Volumina Chloroform extrahiert. Durch Zugabe von gesättigter wäßriger NaCl-Lösung wurde die organische Phase abgetrennt und gesammelt. Die wäßrige Phase wurde noch zweimal wie oben mit Chloroform extrahiert und die organischen Phasen vereinigt, mit Na_2SO_4 entwässert, filtriert und im Vakuum eingedampft.

5.3 Abtrennung des PGE_1 durch Kieselgel-Säulenchromatographie (Caldwell et al. 1971, mit Modifizierungen nach Jaffe et al. 1973; Lagarde et al. 1979)

Der eingedampfte Lipidextrakt wurde in 1,2 ml Benzol-Äthylacetat-Methanol (60 : 40 : 3, v/v/v) gelöst und auf eine Kieselgel-Säule (Sigma SIL-R, 100-300 mesh, 0,6 x 5 cm) aufgetragen. Folgende Fraktionen wurden eluiert: Fraktion 1 mit 6 ml Benzol-Äthylacetat (60 : 40, v/v), die neutrale Lipide, Pigmente, PGA_{1-2} und PGB_{1-2} enthielt; Fraktion 2 mit 8 ml Benzol-Äthylacetat-Methanol (60 : 40 : 3, v/v/v), die PGE_{1-2} enthielt; Fraktion 3 mit 8 ml Benzol-Äthylacetat-Methanol (60 : 40 : 5, v/v/v), die $PGF_{1-2\alpha}$ enthielt. Die Fraktionen wurden unter Anwendung von schwachem Vakuum an der Säule eluiert und sofort mit Stickstoff eingetrocknet.

5.4 Identifizierung der getrennten Substanzen durch Dünnschicht-Chromatographie (Blackwell et al. 1975)

Die Fraktionen 1 bis 3 wurden in je 400 ul Äthanol gelöst und je 100 µl zusammen mit PGE_1 und ^3H-PGE_1 als Vergleichssubstanzen auf eine Dünnschichtplatte (Merck

Silica Gel F-254, 0,25 mm, 20 x 20 cm) aufgetragen. Zur Herstellung des Trennmittels wurde folgende Mischung hergestellt: Äthylacetat-Isooctan-Essigsäure-Wasser (11 : 5 : 2 : 10, v/v/v/v). Die Komponenten wurden gründlich geschüttelt und das Gemisch zur Phasentrennung 30 min. bei 4°C stehengelassen. Dann wurde die organische Phase in eine Trennkammer überführt und 1 Stunde bei Zimmertemperatur äquilibriert. Die Chromatographie wurde bis zur Höhe von 15 - 18 cm auf der Platte entwickelt und diese anschließend getrocknet. Die Substanzflecken wurden mit Joddampf sichtbar gemacht und die ^{3}H-Radioaktivität mit einem Dünnschicht-Scanner (Berthold) lokalisiert. Der dem ^{3}H-PGE_1 entsprechende Fleck wurde isoliert und durch Radioaktivitätsmessung im Scintillationsgerät die Rückgewinnung von PGE_1 berechnet. Sie betrug 66 %.

6. Transmissions-Elektronenmikroskopie
(Mattson et al. 1977)

Thrombozyten-Suspensionen in PBS-Puffer wurden mit 0,2 % Glutaraldehyd im gleichen Puffer 60 min. bei 4°C vorfixiert. Nach Zentrifugation (2.000 x g, 10 min, 4°C) wurden die Pellets über Nacht in 3 % Glutaraldehyd in PBS-Puffer bei 4°C aufbewahrt und dann in Würfel von 1 mm geschnitten. Diese wurden 2 Stunden bei 4°C nachfixiert in 1 % OsO_4 in 0,1 M Kakodylatpuffer mit 5 % Sucrose. Nach Dehydratisierung mit abgestuftem Äthanol und Einbettung in Araldit-Harz wurden Ultradünnschnitte mit einem Reichert Ultramicrotom hergestellt und 15 min. mit Uranylacetat und 1 min. mit Bleicitrat behandelt. Die Präparate wurden mit einem JOEL 100C Elektronenmikroskop ausgewertet.

Die gleiche Prozedur wurde zur Vorbereitung von Membranproben für die Elektronenmikroskopie angewandt, mit dem Unterschied, daß die Membranen 10 min. bei 40.000 x g zentrifugiert wurden.

V. ERGEBNISSE

1. Biologisches Material

1.1 Einsammeln des Blutes, thrombozytenreiches Plasma, gewaschene Thrombozyten

Für die Versuche wurden biologisch intakte, nicht aggregierte Thrombozyten mit hoher Adenylatcyclase-Aktivität benötigt. Die Präparationsmethode mußte daher rasch und unter Kühlung arbeiten, sie sollte einfach, reproduzierbar und mit hoher Ausbeute durchführbar sein. Für die einzelnen Schritte wurden beschriebene Verfahren kombiniert: Einsammeln des Blutes nach Haslam (1964), Herstellung von thrombozytenreichem Plasma nach Woods et al. (1976) und Wolfe et al. (1969), Waschen der Thrombozyten nach Haslam (1964) und Hamberg et al. (1974).

Die nach diesen Verfahren gewonnenen Thrombozyten sind biologisch intakt, denn sie haben die Fähigkeit zur Aggregation und zur Produktion von Arachidonsäure-Metaboliten (Haslam 1964; Hamberg et al. 1974; Claesson et al. 1977). Der Zeitbedarf vom Einsammeln des Blutes bis zum Erhalten gewaschener Thrombozyten betrug 2 - 2,5 Stunden. Obwohl die gesamte Präparation unter Eiskühlung durchgeführt wurde, traten keine Komplikationen durch kälteinduzierte Aggregation auf (Haslam 1964). Eiskühlung ist zur Erhaltung der Adenylatcyclase-Aktivität wichtig, besonders während der Membranpräparation (Krishma et al. 1972). Die Reinheit der Thrombozyten-Präparation wurde durch Zellzählung im Coulter Counter und in der Bürker-Kammer kontrolliert: sie betrug <10 Erythrozyten und <1 Leukozyt pro 10^5 Thrombozyten. Fig. 3 zeigt ein elektronenmikroskopisches Bild gewaschener Thrombozyten. Die Zellen haben glatte Oberfläche und gleichmäßig verteilte Organellen.

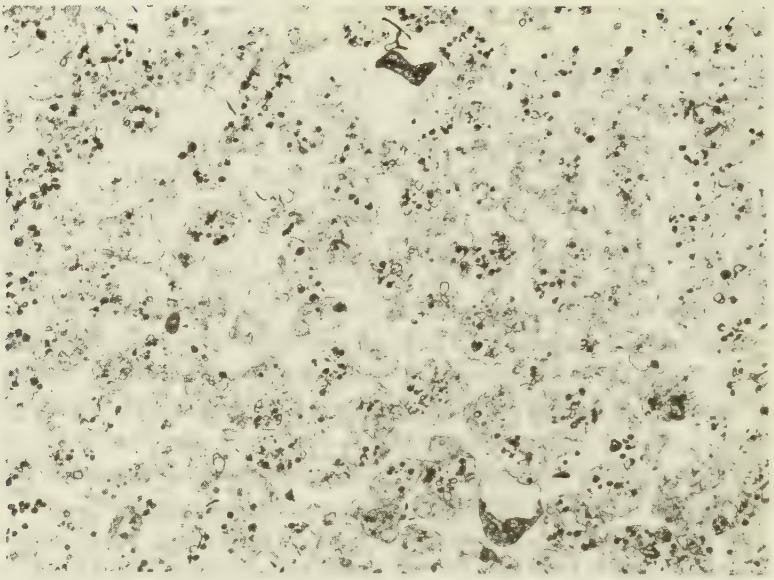


Fig. 3a

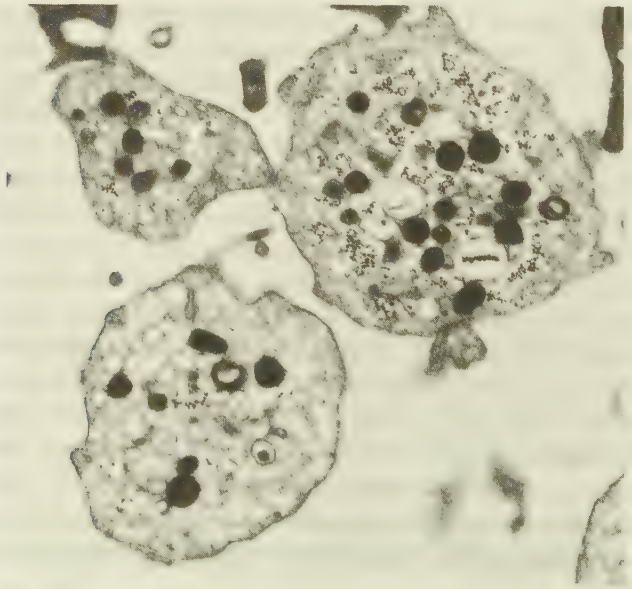


Fig. 3b

Fig. 3: Elektronenmikroskopisches Bild gewaschener Thrombozyten (Vergrößerung a) 6600x und b) 25.000x).

1.2 Membranpräparation

Die Thrombozyten wurden lysiert und durch Sucrose-Gradientenzentrifugation bei $4^{\circ}C$ in einem Schritt gereinigt. Dadurch konnte die Membranfraktion bereits 5 - 6 Stunden nach der Blutentnahme gewonnen werden. Die Präparation besaß hohe Adenylatcyclase-Aktivität, welche bei Aufbewahrung in flüssigem Stickstoff mindestens 2 Monate lang erhalten blieb. Die Reinheit der Präparation wurde elektronenmikroskopisch geprüft. In einem typischen Bild (Fig. 4) erkennt man außer vielen Membranfragmenten und -vesikeln wenig granuläres Material.

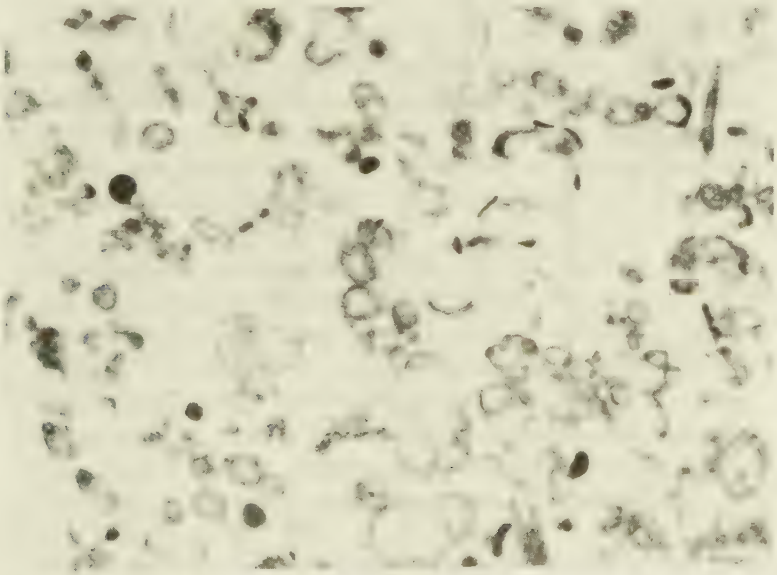


Fig. 4: Elektronenmikroskopisches Bild einer Thrombozyten-Membranpräparation (Vergrößerung 20.000x)

2. Einfluß von PGE_1 auf die Membranfluidität

2.1 Fluoreszenzspektrum von Pyrendecansäure nach Aufnahme in die Membran

In Fig. 5 sind Fluoreszenz-Emissionsspektren einer mit Pyrendecansäure markierten Thrombozyten-Suspension bei

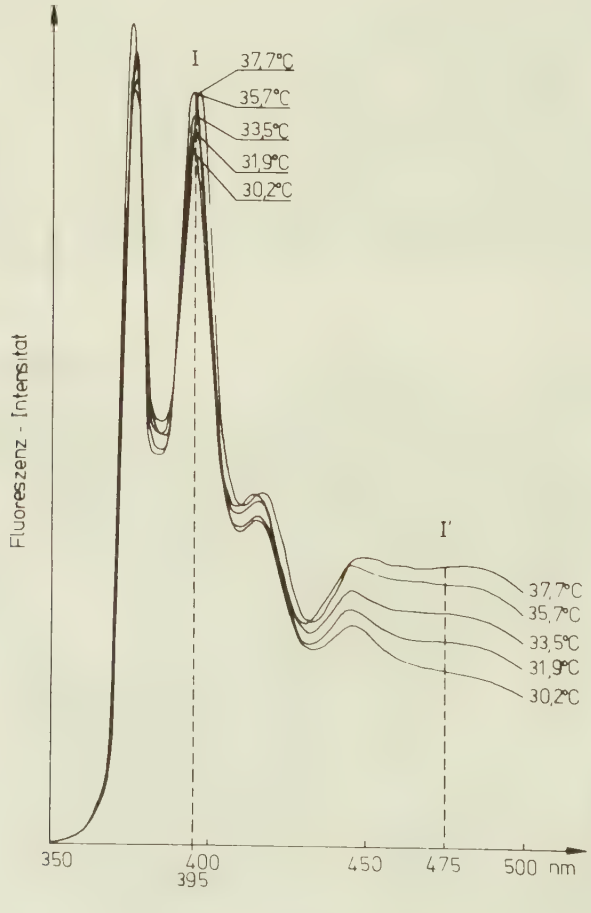


Fig. 5: Fluoreszenz-Emissionsspektren einer mit Pyrendecansäure markierten Thrombozyten-Suspension bei 5 verschiedenen Temperaturen (Exzitation bei 320 nm).

5 verschiedenen Temperaturen wiedergegeben (die gesamte Meßreihe umfaßte 16 verschiedene Temperaturen). Man erkennt, daß mit steigender Temperatur die Fluoreszenzintensität des Monomers (I) bei 395 nm abnimmt und die Fluoreszenzintensität des Excimers (I') bei 475 nm zunimmt. Markierte Liposomen und isolierte Thrombozytenmembranen gaben Spektren des gleichen Typs.

Um die Verteilung der Pyrendecansäure zwischen dem Membranmaterial und der wäßrigen Phase zu bestimmen, wurden die Suspensionen zentrifugiert. Im Überstand war keine Fluoreszenz nachweisbar. Die Pyrendecansäure befand sich demnach quantitativ im Membranmaterial.

2.2 Änderung der Fluidität von Liposomen durch PGE_1

Messungen der Pyrendecansäure-Fluoreszenz in DOPC/DPPC-Liposomen (n = 2) bestätigten qualitativ die Ergebnisse früherer Arbeiten (Sackmann et al. 1977). Bei der Auftragung von I'/I gegen die Temperatur (Fig. 6) wurde durch Unstetigkeiten der Kurve ein Phasenübergang im Bereich von $22{,}5^{\circ}$ - $24{,}5^{\circ}C$ angezeigt, der durch das Schmelzen rigider (DPPC-) Regionen in den Liposomen hervorgerufen wurde (vgl. Theoretischer Teil 4).

In Gegenwart von 8×10^{-6}M PGE_1 (n = 2) war der Beginn des Schmelzvorgangs nach niedrigerer Temperatur ($19^{\circ}C$) verschoben, sein Endpunkt lag fast unverändert bei $24^{\circ}C$. Auch außerhalb des Bereichs der Phasenumwandlung beeinflußte PGE_1 den Verlauf der Kurve: bei tieferen Temperaturen trat eine erhöhte Temperaturabhängigkeit von I'/I auf, bei höheren Temperaturen eine größere Excimer-Bildung als in unbehandelten Liposomen.

Die Ergebnisse bestätigten unsere Hypothese, daß Prostaglandin mit dem Phospholipid-Bilayer in Wechselwirkung tritt und die Membranfluidität erhöht.

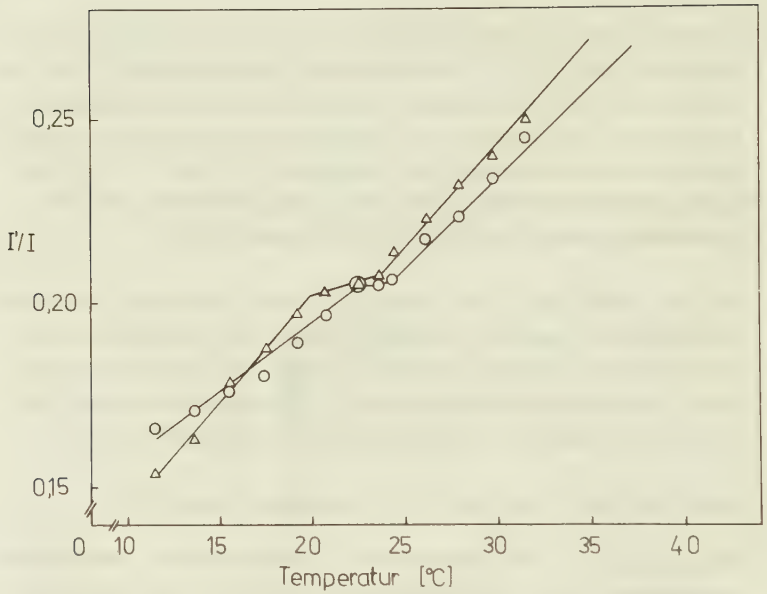


Fig. 6: Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I'/I als Funktion der Temperatur in Liposomen (55 % DOPC, 45 % DPPC) ohne PGE_1 (-o-) und mit 8×10^{-6}M PGE_1 (-Δ-).

2.3 Phasenübergänge in der Thrombozytenmembran und ihre Beeinflussung durch PGE_1

Die Fluoreszenzmessungen mit Pyrendecansäure lieferten Informationen über Phasenübergangs-Temperaturen der Thrombozytenmembran. In Fig. 7 und 8 ist das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten I'/I als Funktion der Temperatur aufgetragen. Der Kurvenverlauf war bei ganzen Zellen (n = 5) und isolierten Membranen (n = 5) gleich. Bei niedrigen Temperaturen (15° - 26°C) war das Verhältnis von I'/I wenig temperaturabhängig. In Analogie zum flachen Bereich in der Schmelzkurve von DOPC/DPPC-Liposomen (Fig. 2 und 6) kann geschlossen werden, daß in

diesem Bereich eine Lipidfraktion der Membran vom quasikristallinen in den fluiden Zustand übergeht. Bei 26°C und bei 31°C nimmt die Steigung der Kurve in zwei diskreten Stufen zu, danach bleibt sie konstant. Das bedeutet, daß zwischen 26°C und 31°C eine weitere Lipidfraktion schmilzt und daß oberhalb von 31°C praktisch alle Membranlipide im fluiden Zustand vorliegen. Der lineare Anstieg von I'/I oberhalb von 31°C wird durch die Viskositätsabnahme der (fluiden) Lipide mit der Temperatur verursacht.

Wie aus Fig. 7 und 8 ersichtlich ist, beeinflußte PGE_1 das Verhältnis von I'/I ausschließlich im Temperaturbereich der Phasenübergänge der Membranlipide vom quasikristallinen zum fluiden Zustand: der Beginn desjenigen Schmelzvorganges, der in der unbehandelten Membran bei 26° - 31°C lag, wurde durch PGE_1 nach niedrigerer Temperatur verschoben. Diese Verschiebung war dosisabhängig im Bereich von 10^{-7}M bis 10^{-5}M PGE_1. Experimente mit ganzen Zellen (n = 3) und mit isolierten Membranen (n = 5) zeigten, daß 10^{-5}M PGE_1 den Beginn des Phasenübergangs um 5 - 6°C nach niedrigerer Temperatur verschob. Ein gleich großer Effekt wurde auch bei Einwirkung von 10^{-5}M $PGF_{2\alpha}$ auf die isolierte Membran beobachtet. Der Endpunkt des Phasenübergangs wurde hingegen durch PGE_1 nicht beeinflußt und lag wie in der unbehandelten Membran bei etwa 31°C.

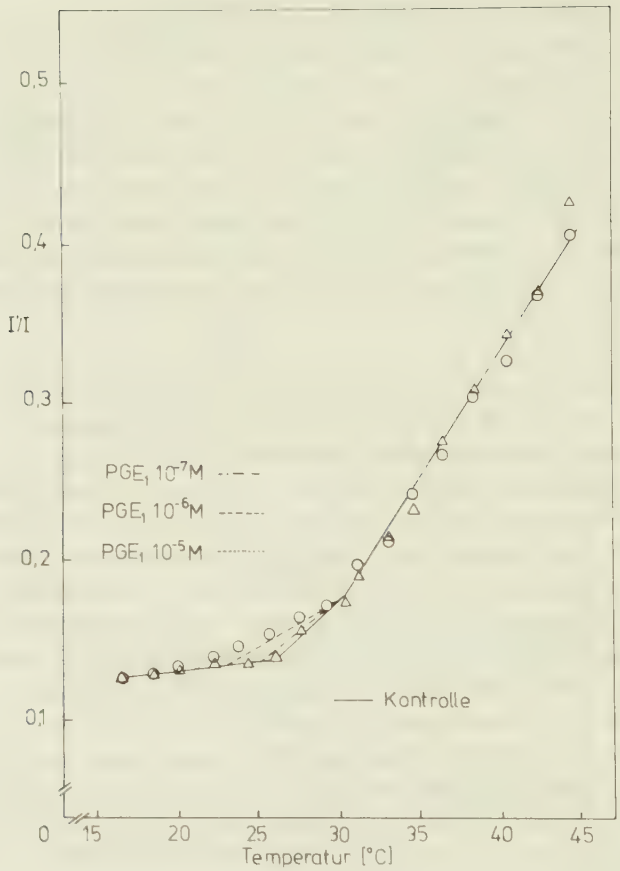


Fig. 7: Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten I'/I als Funktion der Temperatur. Ganze Thrombozyten ohne PGE_1 (-Δ-) sowie mit 10^{-7}M (-.-.-), 10^{-6}M (---) und 10^{-5}M PGE_1 (-o-).

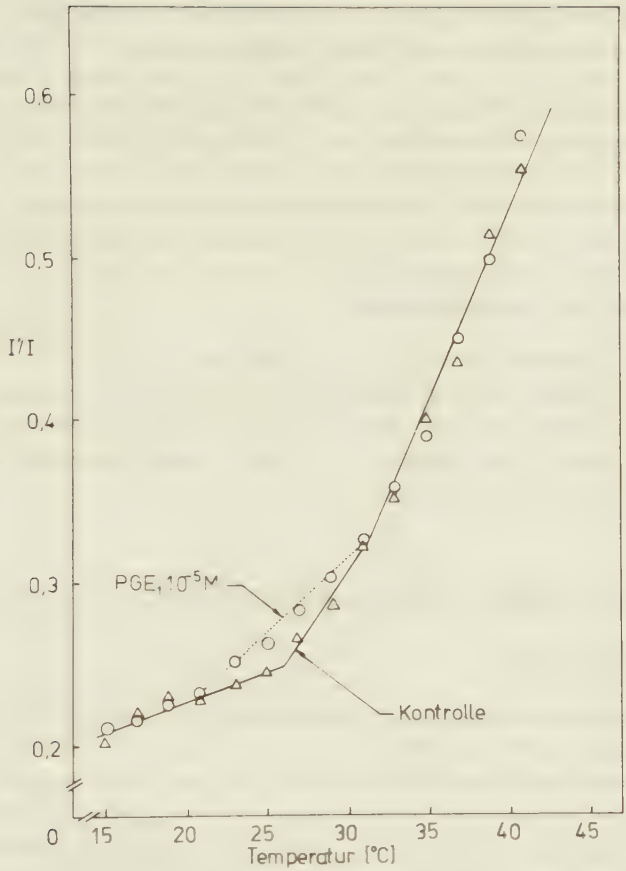


Fig. 8: Verhältnis der Fluoreszenz-Intensitäten I'/I als Funktion der Temperatur. Isolierte Thrombozytenmembranen ohne PGE_1 (-Δ-) sowie mit 10^{-5}M PGE_1 (-o-).

2.4 Bestimmung des molaren Verhältnisses von PGE_1 : Phospholipid bei den Fluoreszenzmessungen

Die von den Zellen bzw. Membranen gebundene Menge PGE_1 wurde unter Verwendung von ^3H-PGE_1 als Tracer ermittelt. Zur Abschätzung der Phospholipid-Konzentration wurde angenommen, daß das Verhältnis von Phospholipid : Protein in der Membran 10 : 7 (w/w) beträgt (Sixma et al. 1978). Als mittleres Molgewicht der Phospholipide wurde 700 zugrundegelegt.

Nach Inkubation des biologischen Materials mit 10^{-5}M PGE_1 wurde für das molare Verhältnis von gebundenem PGE_1 : Phospholipid ein Wert von 1 : 5600 ($\pm$ 900; n = 5) ermittelt. Bestimmungen mit Zellen und Membranen ergaben sehr ähnliche Werte

3. Stimulierung der Adenylatcyclase durch PGE_1

3.1 Intakte Zellen

Beim Adenylatcyclasetest wurde das von den Zellen gebildete cAMP extrahiert und gereinigt, wie im Abschnitt Methoden beschrieben ist, und nach der Methode von Gilman (1970) bestimmt. Zur Inhibierung der Phosphodiesterase wurden die Proben vor dem Adenylatcyclasetest 1 Minute mit IBMX inkubiert. Durch Kontrollversuche (n = 3) war sichergestellt worden, daß eine Vorinkubation mit IBMX über 1, 3 und 5 Minuten den Basalwert der cAMP-Bildung nicht verändert. Bei den gewählten Testbedingungen erreichte die cAMP-Bildung nach 3 Minuten einen Maximalwert, der bei längerer Inkubationszeit konstant blieb. Daher wurde bei allen Experimenten eine Inkubationszeit von 3 Minuten gewählt.

Prostaglandin E_1 bewirkte eine dosisabhängige Erhöhung des Basalwertes der cAMP-Bildung (Fig. 9) mit halbmaximaler Wirkung bei $0,8 \times 10^{-6}$M PGE_1. Bei 10^{-5}M PGE_1 und 37°C wurde eine bis zu 12fache Erhöhung des Basalwertes gemessen (Tabelle 1).

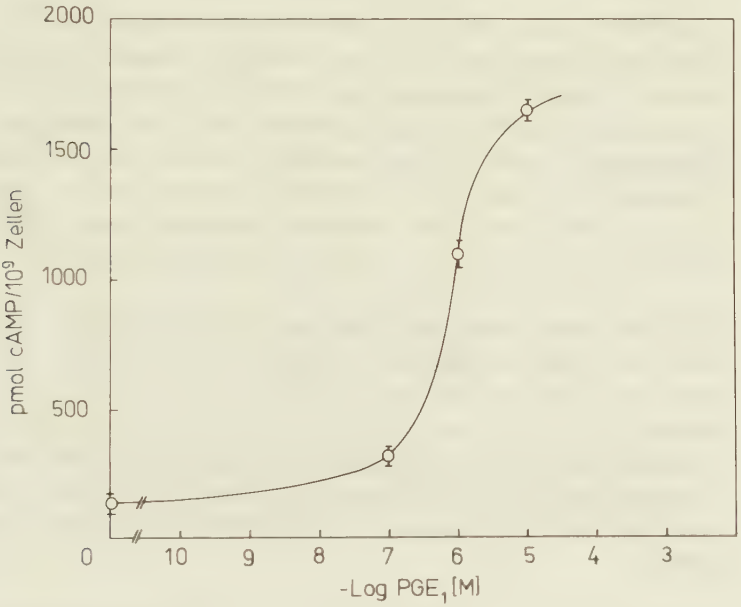


Fig. 9: cAMP-Bildung nach 3 Minuten bei 37°C in intakten Thrombozyten in Abhängigkeit von der PGE_1-Konzentration.

Tab. 1: Bildung von cAMP durch intakte, gewaschene Thrombozyten bei 37°C.

Zellkonzentration	$(0,31 \pm 0,05) \times 10^9$/ml (n = 8)
Basalwert der cAMP-Bildung (3 Minuten, 37°C)	(127 ± 13) pmol cAMP/10^9 Zellen (n = 8)
cAMP-Bildung nach Inkubation mit 10^{-5} PGE_1 (3 Minuten, 37°C)	(1520 ± 128) pmol cAMP/ 10^9 Zellen (n = 5)

Die Wirkung von PGE_1 auf die Adenylatcyclase wurde im Temperaturbereich von 16°C bis 37° C untersucht (n = 2). Hierdurch sollte geprüft werden, ob die Schmelzkurve der Membran mit der Temperaturabhängigkeit der Cyclase-Stimulierung korreliert werden kann.

Die cAMP-Bildung nimmt in nichtlinearer Weise mit der Temperatur zu (Fig. 10). Die stärkste Temperaturabhängigkeit wurde im Bereich von 22°C bis 28°C beobachtet. In diesem Temperaturbereich wurden 50 % der gesamten Erhöhung der cAMP-Bildung gmessen. Wesentlich geringere Temperaturabhängigkeit zeigte die cAMP-Bildung zwischen 17°C und 22°C (20 % der gesamten Erhöhung) sowie zwischen 28°C und 37°C (30 % der gesamten Erhöhung).

Aus den Fluoreszenzmessungen war gefolgert worden, daß die unbehandelte Membran zwischen 26°C und 31°C schmilzt, während der Schmelzbereich der mit PGE_1 behandelten Membran zwischen 21°C und 31°C liegt. Die stärkste Zunahme der cAMP-Bildung mit der Temperatur beginnt bei 22°C. Sie korreliert also gut mit dem Beginn des Schmelzvorganges der Membran in Gegenwart von PGE_1.

Der Basalwert der cAMP-Bildung ist im gemessenen Temperaturbereich konstant. Dieser Wert könnte daher die bei 37°C vorliegende Dauerkonzentration von cAMP in der Zelle widerspiegeln.

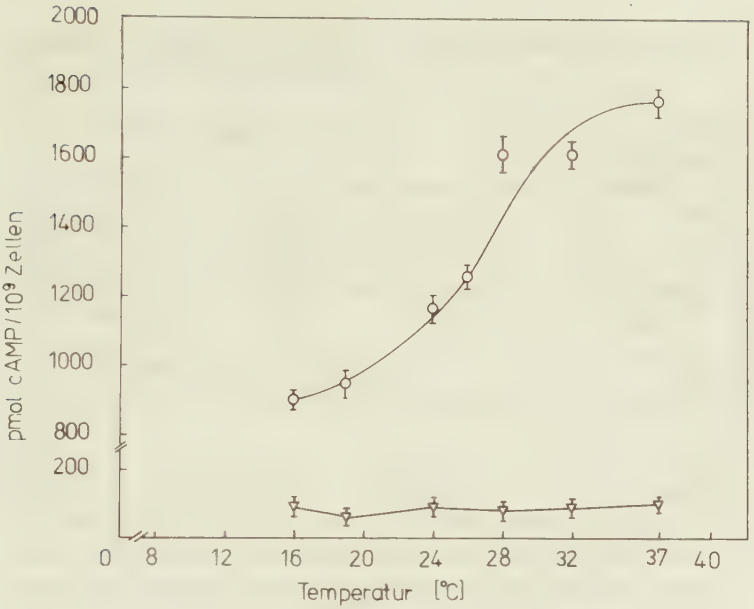


Fig. 10: Temperaturabhängigkeit der cAMP-Bildung in intakten Thrombozyten in Gegenwart von 10^{-5}M PGE_1. Inkubationsdauer 3 Minuten. PGE_1-stimulierte Adenylatcyclase-Aktivität (-o-), Basal-Aktivität (-▽-).

3.2 Isolierte Membranen

Die Bestimmung der Adenylatcyclase-Aktivität erfolgte nach der Methode von Gilman (1970). Im Bereich von 40 µg bis 100 µg Protein/Probe war die cAMP-Bildung proportional zur Proteinkonzentration. Daher wurden die Experimente mit 70 µg Protein/Probe durchgeführt. Bei 37°C stieg die cAMP-Produktion bis zu 10 Minuten Inkubationsdauer linear mit der Zeit, daher wurden bei jedem Versuch Proben-Duplikate mit 3 Minuten und mit 6 Minuten Inkubationsdauer getestet.

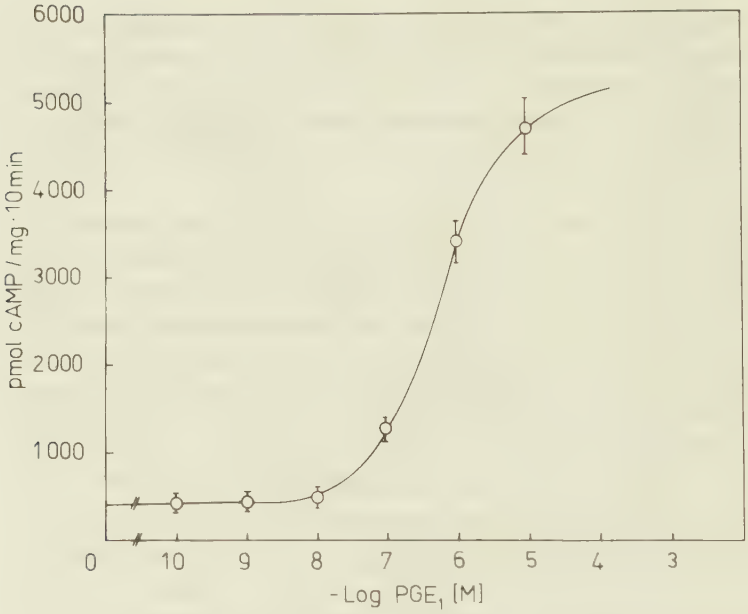


Fig. 11: cAMP-Bildung in isolierten Membranen nach 10 Minuten bei 37°C; Abhängigkeit von der PGE_1-Konzentration.

PGE_1 bewirkte im Bereich von 10^{-7}M bis 10^{-5}M eine starke Stimulierung der Adenylatcyclase (Fig. 11); halbmaximale Wirkung wurde bei etwa $0{,}6 \times 10^{-6}$M PGE_1 beobachtet. Durch 10^{-5}M PGE_1 wurde die cAMP-Produktion auf das 10-fache des Basalwertes angehoben (Tabelle 2). 10^{-4}M $PGF_{2\alpha}$ bewirkte nur eine Stimulierung auf das 3,6fache des Basalwertes, 10^{-2}M NaF auf das 3fache.

Tab. 2: Adenylatcyclase-Aktivität in isolierten Membranen bei 37°C.

Stimulierung	(pmol cAMP x mg^{-1} x 10 min^{-1})		Vielfaches des Basalwertes
Basalwert	440 ± 70	(n = 9)	-
10^{-2}M NaF	1380 ± 150	(n = 4)	3,1fach
10^{-5}M PGE_1	4210 ± 700	(n = 8)	9,9fach
10^{-5}M $PGF_{2\alpha}$	710	(n = 2)	1,6fach
10^{-4}M $PGF_{2\alpha}$	1598	(n = 2)	3,6fach

Ebenso wie bei intakten Zellen wurde bei Membranen die Wirkung von 10^{-5}M PGE_1 auf die Adenylatcyclase in einem größeren Temperaturbereich (von 8°C bis 40°C) untersucht (Fig. 12). Die Basalaktivität des Enzyms zeigte im Bereich von 8°C bis 37°C nur eine geringfügige Zunahme. Die durch PGE_1 stimulierte cAMP-Bildung nahm am stärksten zu zwischen ca 21°C und 32°C. Im Bereich von 8°C bis 21°C war die Zunahme geringer, und zwischen 37°C und 40°C wurde eine leichte Abnahme sowohl der PGE_1-stimulierten wie der basalen Cyclaseaktivität gemessen. Diese könnte durch partielle Denaturierung des Enzyms verursacht sein.

Ebenso wie bei intakten Zellen korreliert also bei isolierten Membranen der Bereich größter Temperaturabhängigkeit der PGE_1-stimulierten Adenylatcyclase-Aktivität gut mit dem Schmelzbereich der mit PGE_1 behandelten Membran.

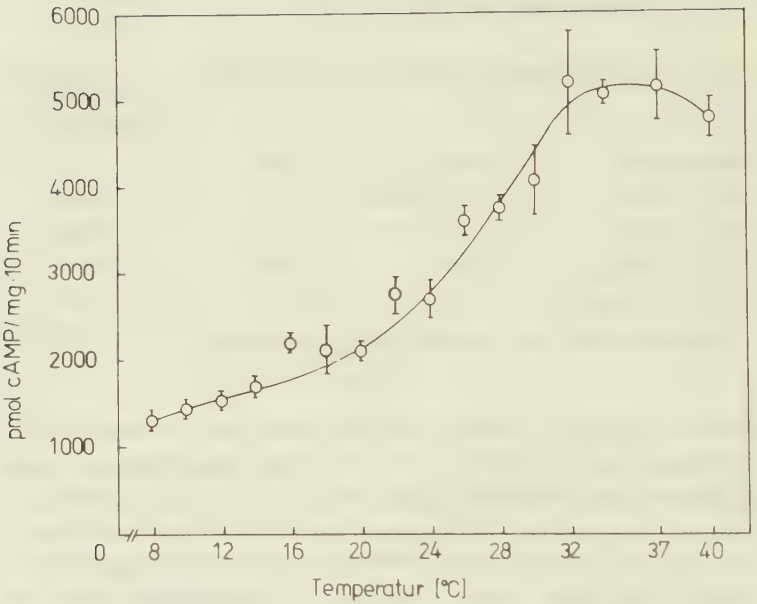


Fig. 12: Temperaturabhängigkeit der cAMP-Bildung in isolierten Membranen unter der Wirkung von 10^{-5}M PGE_1. Inkubationsdauer 10 Minuten. Basal-Aktivität abgezogen.

4. Bindungsstudien mit ^{3}H-PGE_1 und isolierten Thrombozytenmembranen

4.1 Abhängigkeit der Bindung von der Inkubationszeit und der Proteinkonzentration

Die Bindung von ^{3}H-PGE_1 an isolierten Membranen ist ein schneller Vorgang. Bei 37°C wurden 65 % der maximal gebundenen Menge innerhalb von 1 Minute von der Membran gebunden. Nach 5 Minuten erreichte die gebundene Menge ^{3}H-PGE_1 einen Plateauwert, der während der nächsten 20

Minuten konstant blieb. Die folgenden Experimente wurden daher mit 10 Minuten Inkubationszeit bei 37°C ausgeführt.

Die spezifische Bindung von ^{3}H-PGE$_1$ war eine lineare Funktion der Proteinkonzentration im Bereich von 50 bis 250 µg Membranprotein pro getestetes Aliquot (entsprechend 175 bis 875 µg pro Inkubationsprobe). Die meisten Experimente wurden mit 500 µg Membranprotein pro Probe durchgeführt. Weniger als 1 % des gesamten ^{3}H-PGE$_1$ wurden gebunden; die Konzentration an freiem Ligand war also quasi konstant während eines Experiments.

4.2 Bindung in Abhängigkeit von der ^{3}H-PGE$_1$-Konzentration

Thrombozytenmembranen wurden mit Konzentrationen von ^{3}H-PGE$_1$ im Bereich von 4,5 bis 150 nM inkubiert (n = 3). Die direkte Auftragung (Fig. 13) und der Scatchard-Plot der Bindungsdaten (Fig. 14) ließen erkennen, daß zwei Klassen von Bindungsstellen vorliegen: eine geringe Konzentration (23 fmol/mg Protein) von Bindungsstellen mit hoher Affinität (K_D^H = 13 nM) und eine höhere Konzentration ($\geq$ 120 fmol/mg Protein) von Bindungsstellen mit niedriger Affinität (K_D^L = 0,5 µM). Bei der höchsten angewandten Konzentration von ^{3}H-PGE$_1$ waren die niederaffinen Bindungsstellen noch nicht vollständig abgesättigt.

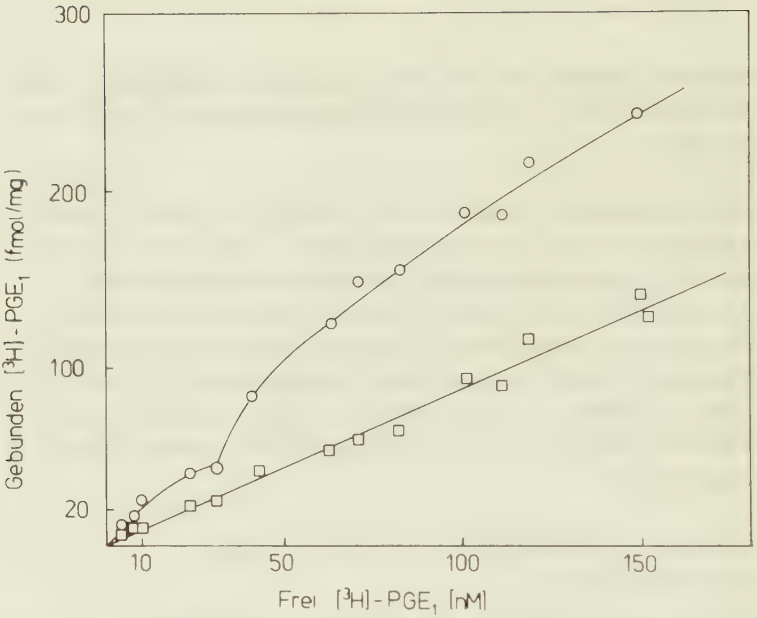


Fig. 13: Bindung steigender Konzentrationen von ^{3}H-PGE$_1$ an isolierte Membranen; gesamte Bindung (-o-), unspezifische Bindung in Anwesenheit von $3{,}8 \times 10^{-5}$M PGE$_1$ (-□-).

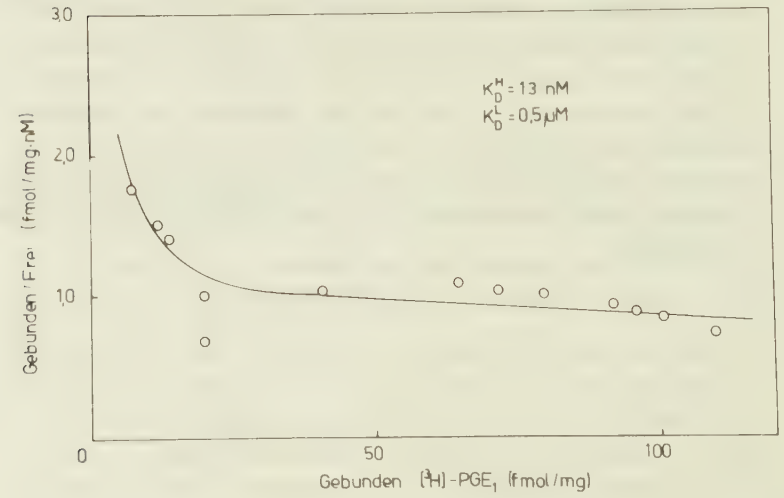


Fig. 14: Bindung von ^{3}H-PGE$_1$ an isolierte Membranen; Auswertung der Daten aus Fig. 13 nach Scatchard.

4.3 Inhibierung der Bindung von ^{3}H-PGE$_1$ durch PGE$_1$ und PGF$_{2\alpha}$

Die Bindung von 90 nM ^{3}H-PGE$_1$ wurde in Gegenwart steigender Konzentrationen der nicht radioaktiven Prostaglandine gemessen (n = 3) (Fig. 15). Bei der angewandten Konzentration des ^{3}H-PGE$_1$ waren 100 % der hochaffinen Bindungsstellen und etwa 30 % der niederaffinen Bindungsstellen mit ^{3}H-PGE$_1$ abgesättigt.

Die Inhibierungskurve mit PGE$_1$ zeigt zwei Stufen, die der Verdrängung des ^{3}H-PGE$_1$ von den beiden Klassen an Bindungsstellen entsprechen. Aus der PGE$_1$-Konzentration bei jeweils 50 %iger Inhibierung (C_{50}) wurden nach der

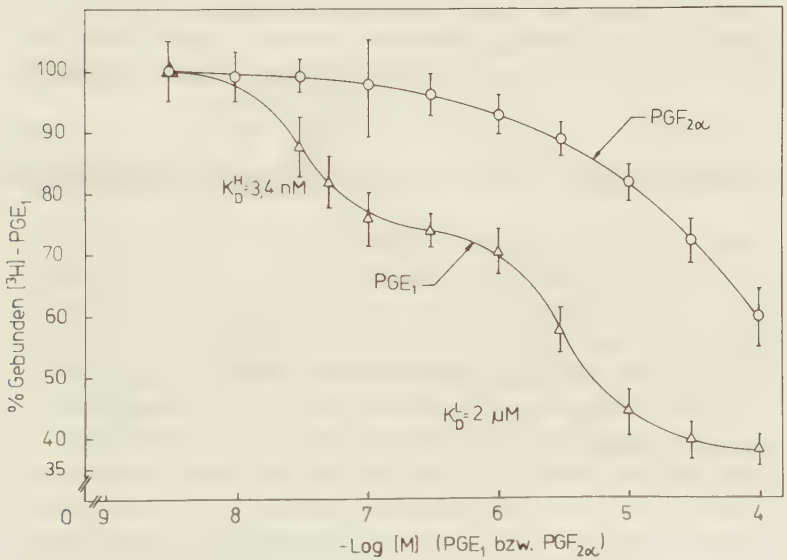


Fig. 15: Inhibierung der Bindung von 90 nM ^{3}H-PGE$_1$ an isolierte Membranen durch PGE$_1$ (-Δ-) und PGF$_{2\alpha}$ (-o-).

Beziehung (Williams und Lefkowitz 1978)

$$K_D = \frac{C_{50}}{1 + \left[{}^3\text{H-PGE}_1\right] / K_D^*}$$

(K_D^* = Dissoziationskonstanten der Bindung von ${}^3\text{H-PGE}_1$) die K_D-Werte der Bindung von PGE_1 an beide Bindungsstellen berechnet. Die so ermittelten Werte (K_D^H = 3,4 nM; K_D^L = 2,0 μM) stimmen gut überein mit den beiden aus dem Scatchard-Plot erhaltenen Werten der Dissoziationskonstanten.

Von Prostaglandin $PGF_{2\alpha}$ waren wenigstens mikromolare Konzentrationen zur Inhibierung der ${}^3\text{H-PGE}_1$-Bindung erforderlich. Die hochaffinen Bindungsstellen sind demnach selektiv für das biologisch wirksamere PGE_1. $PGF_{2\alpha}$ wird von ihnen entweder überhaupt nicht oder nur bei extrem hohen angewandten Konzentrationen gebunden.

5. Rückgewinnung von PGE_1 nach Inkubation mit Thrombozyten

Bevor die beobachteten Effekte von 10^{-5}M PGE_1 eindeutig dem intakten Prostaglandin zugeordnet werden konnten, mußte die Möglichkeit einer Metabolisierung von PGE_1 in der Thrombozytenmembran überprüft werden. Hierzu wurden Thrombozyten-Suspensionen mit 10^{-5}M PGE_1 wie bei den Fluoreszenzmessungen inkubiert und anschließend zur Rückgewinnung des PGE_1 aufgearbeitet und analysiert. Zur empfindlicheren Detektion des PGE_1 und eventueller Metabolite wurde den Ansätzen ${}^3\text{H-PGE}_1$ als Tracer zugegeben. Nach der Inkubation der Ansätze, vor der Lipidextraktion, wurde 0,83 % der zugegebenen ${}^3\text{H-PGE}_1$-Radioaktivität in den Thrombozyten wiedergefunden. Extraktion, Trennung durch Säulenchromatografie und Identifizierung der Lipide sind im einzelnen im Abschnitt

Methoden beschrieben. Die Fraktionen 1 bis 3 der Kieselgel-Säulenchromatografie wurden durch Dünnschicht-Chromatografie analysiert. In Fraktion 2 wurde ^{3}H-PGE_1 durch Radioaktivitäts-Scanning und Vergleich des R_F-Wertes (0,17) mit Standards von PGE_1 und ^{3}H-PGE_1 identifiziert. Außer dem Fleck von ^{3}H-PGE_1 war keine weitere radioaktive Substanz in den Fraktionen 1 bis 3 nachweisbar. Der Fleck des rückgewonnenen ^{3}H-PGE_1 wurde von der Dünnschichtplatte isoliert und im Scintillationszähler quantitativ bestimmt. Die Rückgewinnung von ^{3}H-PGE_1 betrug 66 %. Aus der relativ hohen Ausbeute der Rückgewinnung und der Abwesenheit anderer radioaktiver Rückgewinnungsprodukte kann geschlossen werden, daß PGE_1 während der Inkubation mit Thrombozyten nicht metabolisiert wird.

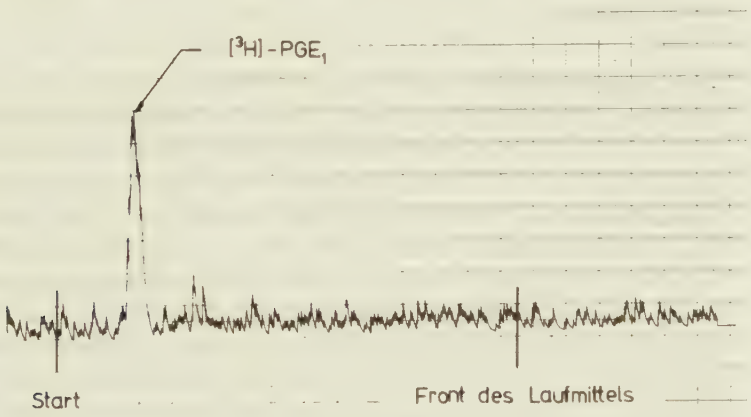


Fig. 16: Radioaktivitäts-Scan der Dünnschicht-Chromatografie von Fraktion 2 der PGE_1-Rückgewinnung.

VI. DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Wirkung von PGE_1 auf die Adenylatcyclase und die Fluidität der Thrombozytenmembran aufzuzeigen. Zunächst wurde die Wirkung von PGE_1 an Liposomen als einfachem Modell der biologischen Membran getestet. Die Ergebnisse zeigten, daß PGE_1 den Beginn des Schmelzens quasikristalliner Lipidregionen nach tieferer Temperatur verschiebt. An ganzen Thrombozyten und isolierten Thrombozytenmembranen wurde durch 10^{-5}M PGE_1 der Beginn eines Lipid-Phasenübergangs um 4 - 6°C nach tieferen Temperaturen verschoben. Die Schmelzkurve der Membran wurde jedoch nur im Bereich von 20° - 30°C durch PGE_1 verändert. Das Verhältnis von aufgenommenem PGE_1 : Phospholipid in der Membran betrug 1 : 5600 (mol/mol).

Nach welchem Mechanismus PGE_1 die Thrombozytenmembran fluidisiert, ist ungeklärt. PGE_1 hat lipidähnliche Strukturmerkmale: eine endständige polare Gruppe (-COOH) sowie zwei aliphatische Ketten. Dadurch könnte PGE_1 relativ leicht mit Membranlipiden in Wechselwirkung treten und sich zwischen die aliphatischen Seitenketten der Lipide schieben. Die fluidisierende Wirkung von DOPC, DMPC und cis-Vaccensäure auf Membranen kommt durch derartige Wechselwirkungen mit den Nachbarlipiden zustande. Nach Anreicherung von Thrombozytenmembranen mit DOPC wurden gleichartige Veränderungen der Membran-Schmelzkurve beobachtet wie mit PGE_1. Ein Effekt gleicher Größe wie bei 10^{-5}M PGE_1 trat jedoch erst bei einem Verhältnis von 1 mol aufgenommenem DOPC zu 10 mol Gesamt-Phospholipid auf (Bakardjieva, unveröffentlichte Ergebnisse). Cis-Vaccensäure fluidisierte Truthahn-Erythrozytenmembranen bei einem Verhältnis von 1 mol cis-Vaccensäure zu 3 mol Phospholipid (Hanski et al. 1979).

PGE_1 wirkte also bei viel geringerer Konzentration als die erwähnten Substanzen. Man kann sich schwer vorstellen, daß bei statistischer Verteilung von jeweils einem PGE_1-Molekül auf 5600 Phospholipid-Moleküle die gesamte Membran fluidisiert wird. Falls PGE_1 jedoch spezifisch von bestimmten Lipiden gebunden wird, könnte es sich in Domänen dieser Lipide anreichern und deren Phasenübergangs-Temperatur erniedrigen. Dadurch würden lokale Fluiditätserhöhungen in der Membran hervorgerufen. Die beobachteten Änderungen der Membran-Schmelzkurve in Gegenwart von PGE_1 können gut mit der Fluidisierung bestimmter Lipid-Domänen in der Membran erklärt werden.

Ein interessanter Fall von indirekter Erhöhung der Membranfluidität durch ein Hormonanalog soll in diesem Zusammenhang erwähnt werden. Nach Bindung von Isoproterenol am ß-adrenergen Rezeptor von Ratten-Retikulozyten wurde die Methylierung von Phosphatidyläthanolaminen durch Methyltransferasen stimuliert. Dies führte zu einer Erhöhung der Membranfluidität (Hirata und Axelrod 1978; Hirata et al. 1979). Es ist bemerkenswert, daß diese Fluidisierung bereits bei einer Methylierung von weitaus weniger als 1 % der Gesamt-Phospholipide der Membran auftrat. Man kann daher auch in diesem Fall vermuten, daß nur bestimmte Lipid-Domänen fluidisiert werden. PGE_1 verursachte an künstlichen Liposomen und Thrombozytenmembranen eine vergleichbare Erhöhung der Membranfluidität. Daher gibt es keine Veranlassung zu der Annahme, daß die Aktivierung bestimmter Membranenzyme bei der Fluidisierung der Thrombozytenmembran durch PGE_1 eine Rolle spielt.

Die zur Fluiditätsänderung erforderliche Konzentration von PGE_1 (10^{-5}M) korrelierte gut mit der Dosis/Wirkungskurve der Adenylatcyclase-Aktivierung in Thrombozytenmembranen:

halbmaximale Aktivierung des Enzyms wurde bei 8×10^{-7}M und annähernd maximale Stimulierung bei 10^{-5}M PGE_1 erreicht. In diesem Zusammenhang ist es interessant, daß in einigen Zellen, die keine Prostaglandin-Rezeptoren besitzen, trotzdem Wirkungen von PGE_1 auf den cAMP-Spiegel beobachtet wurden. PGE_1 inhibiert die Ausschleusung von cAMP in Tauben-Erythrozyten, ohne mit der adrenergischen Stimulierung der Adenylatcyclase zu interferieren (Brunton und Mayer 1979). In Truthahn-Erythrozyten hemmt 10^{-6} - 10^{-5}M PGE_1 nicht-kompetitiv die Adrenalin-stimulierte cAMP-Produktion (Shaw et al. 1971).

Da die Fluiditätserhöhung der Membran durch PGE_1 in einem definierten Temperaturbereich von etwa 20° - 30°C auftrat, war es interessant, die Temperaturabhängigkeit der Adenylatcyclase-Stimulierung durch PGE_1 zu messen. Es zeigte sich, daß die Enzymaktivität ihren stärksten Anstieg im Bereich von 21° - 32°C hat und bereits bei 34°C ein Plateau erreicht. Die Basalaktivität der Adenylatcyclase ist dagegen fast unabhängig von der Temperatur. Die geschilderten Befunde deuten auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Membranfluidisierung und Adenylatcyclase-Aktivierung durch PGE_1.

Die Existenz spezifischer Membranrezeptoren für PGE_1 in Thrombozyten ist durch mehrere Untersuchungen belegt (Schafer et al. 1979; Siegl et al. 1979; Miller und Gorman 1979). Wir haben daher die Bindung von ^{3}H-PGE_1 an Thrombozytenmembranen über einen großen Bereich angewandter Konzentrationen gemessen. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der gerade zitierten Autoren konnten zwei Bindungsstellen identifiziert werden: eine geringe Population von hochaffinen Stellen (23 fmol/mg Protein; $K_D^H = 13 \times 10^{-9}$M) und eine große Population niederaffiner Stellen ($\geq$ 120 fmol/mg Protein; $K_D^L = 5 \times 10^{-7}$M). Beide Typen von Bindungsstellen wurden durch die Ergebnisse von Verdrängungsexperimenten bestätigt, bei denen

die Bindung von ^{3}H-PGE_1 durch steigende Konzentrationen von kaltem PGE_1 inhibiert wurde.

Die Existenz von zwei Klassen von Bindungsstellen für PGE_1 ist nicht auf Thrombozyten beschränkt. Ähnliches Bindungsverhalten wurde auch in anderen Systemen beschrieben: Thyroidea-Membran und Corpus-luteum-Membran vom Rind, verschiedene Zellklone und Frosch-Erythrozyten (Moore und Wolff 1973; Rao 1974; Brunton et al. 1976; Lefkowitz et al. 1977). Es ist eine interessante Frage, ob beide Bindungsstellen oder nur eine für die physiologische Wirkung des PGE_1 relevant sind oder ist.

In Analogie zu anderen Hormon-Rezeptor-Systemen ist man geneigt, die hochaffine Bindungsstelle für die wichtigere zu halten. Die Bindung von PGE_1 an diesen Stellen zeigte eindeutige Sättigung. Nach Schafer et al. (1979) wird PGE_1 reversibel gebunden. Der K_D^H-Wert der Bindung liegt jedoch um 2 Größenordnungen unter dem K_A-Wert der Adenylatcyclase-Aktivierung durch PGE_1. Wenn die hochaffinen Bindungsstellen physiologisch relevant sind, kann ihre Absättigung durch PGE_1 also nicht die einzige Voraussetzung für den biologischen Effekt darstellen.

Auch bei Frosch-Erythrozyten wurde eine Diskrepanz zwischen K_D der Bindung und K_A der Adenylatcyclase-Stimulierung durch PGE_1 gefunden (Lefkowitz et al. 1977). Bei einigen Zellklonen korrelieren beide Konstanten jedoch gut (Brunton et al. 1976). Es ist bemerkenswert, daß in Thyroidea-Membranen vom Rind die hochaffinen PGE_1-Bindungsstellen höher konzentriert vorkommen als die niederaffinen Stellen. ^{3}H-PGE_1 wurde jedoch von den hochaffinen Stellen durch einfache Fettsäuren verdrängt. Diese Bindung wurde daher als unspezifische Aufnahme von ^{3}H-PGE_1 in die Lipidmatrix interpretiert (Moore und Wolff 1973).

Die Besetzung der niederaffinen Bindungsstellen durch PGE_1 ($K_D^L = 5 \times 10^{-7}$M) korreliert sehr gut mit der Stimulierung der Adenylatcyclase ($K_A = 8 \times 10^{-7}$M). Da relativ hohe PGE_1-Konzentrationen (> 10^{-5}M) zu ihrer Sättigung erforderlich sind, könnte es sich bei dieser Bindung um eine Wechselwirkung von PGE_1 mit Membranlipiden handeln.

Zur Aufklärung der Frage, welche der beobachteten Effekte von PGE_1 auf Membranfluidität, Adenylatcyclase und Bindungsstellen biologisch relevant sind, wurde das biologisch wesentlich weniger aktive $PGF_{2\alpha}$ als Vergleichssubstanz herangezogen. In der folgenden Tabelle sind die mit beiden Prostaglandinen ermittelten Daten zusammengestellt.

Tab. 3: Wirkungen von PGE_1 und $PGF_{2\alpha}$ an Thrombozytenmembranen

Prostaglandine	Hochaffine Bindung K_D (M)	Niederaffine Bindung K_D (M)	Adenylatcyclase-Aktivierung K_A (M)	Zur Membranfluidisierung erforderliche Konzentration (M)
PGE_1	13×10^{-9}	5×10^{-7}	8×10^{-7} (100 % Aktivierung erreichbar)	10^{-5}
$PGF_{2\alpha}$	---	$> 10^{-6}$	$\gg 10^{-6}$ (40 % Aktivierung erreichbar)	10^{-5}

Für $PGF_{2\alpha}$ existiert in Thrombozytenmembranen keine hochaffine Bindungsstelle. Die Adenylatcyclase kann mit diesem Prostaglandin nur auf maximal 40 % des mit PGE_1 erzielbaren Wertes stimuliert werden. Bei ihrer membranfluidisierenden Wirkung

und der Bindung an niederaffine Stellen unterscheiden sich beide Prostaglandine jedoch kaum.

Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, daß die Besetzung eines hochaffinen Rezeptors (vermutlich eines Membranproteins) eine notwendige, aber nicht hinreichende Voraussetzung für die volle Stimulierung der Adenylatcyclase in Thrombozytenmembranen durch Prostaglandine ist. Als weitere Voraussetzungen kommen die Absättigung der niederaffinen Bindungsstellen und die Fluidisierung der Membran in Betracht. Da diese beiden Vorgänge im gleichen Konzentrationsbereich (10^{-6}M bis 10^{-5}M PGE_1 oder $PGF_{2\alpha}$) stattfinden, handelt es sich vielleicht um ein und dasselbe Phänomen: Wechselwirkung von Prostaglandin mit Membranlipiden.

Die Aktivierung der Adenylatcyclase von Truthahn-Erythrozyten durch den ß-adrenergen Rezeptor nimmt proportional zur Membranfluidität zu. Sie verläuft wahrscheinlich nach dem Kollisions-Kopplungs-Mechanismus (Hanski et al. 1979). Bei Ratten-Retikulozyten bewirkt ß-adrenerge Stimulierung eine Erhöhung der Membranfluidität, die durch Methylierung bestimmter Lipide zustandekommt. Dadurch wird die Lateraldiffusion des Rezeptors erleichtert und seine Kopplung mit Adenylatcyclase ermöglicht (Hirata und Axelrod 1978; Hirata et al. 1979).

Aufgrund der vorliegenden Daten kann man spekulieren, daß die Stimulierung der Cyclase in Thrombozyten durch PGE_1 nach einem vergleichbaren Mechanismus abläuft. Bereits nanomolare Konzentrationen von PGE_1 besetzen den spezifischen Membranrezeptor, eine Stimulierung der Adenylatcyclase bleibt jedoch aus. Erst wenn durch mikromolare PGE_1-Konzentrationen die Fluidität der Membran oder bestimmter Lipiddomänen erhöht wird, können die mit PGE_1 besetzten Rezeptoren hinreichend gut diffundieren, um durch Kollisions-Kopplung die Adenylatcyclase zu stimulieren.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluß physiologisch wirksamer Konzentrationen von Prostaglandin E_1 (PGE_1) auf die Fluidität der Thrombozytenmembran wurde mit Hilfe von Pyrendecansäure als Fluoreszenzindikator untersucht. Die Temperaturabhängigkeit des Fluoreszenz-Intensitätsverhältnisses von Excimer zu Monomer (I'/I) wurde in Anwesenheit und Abwesenheit von PGE_1 gemessen. Im Bereich von 20^o - 30^oC verursachte $10^{-5}M$ PGE_1 eine Erniedrigung der Phasenübergangs-Temperatur einer Lipidfraktion um 4^o - 6^oC. Ein gleich großer Effekt wurde auch mit $10^{-5}M$ $PGF_{2\alpha}$ beobachtet. An künstlichen Liposomen bewirkte PGE_1 ebenfalls eine Fluiditätserhöhung.

Die Adenylatcyclase der Thrombozytenmembran wurde durch $8 \times 10^{-7}M$ PGE_1 halbmaximal und durch $10^{-5}M$ annähernd maximal stimuliert. $PGF_{2\alpha}$ verursachte selbst bei einer Konzentration von $10^{-4}M$ nur 40 % der Wirkung von PGE_1. Die Temperaturabhängigkeit der Adenylatcyclase-Stimulierung durch $10^{-5}M$ PGE_1 zeigte einen steilen Anstieg im Bereich von 21^o - 32^oC.

Durch Bindung von ^3H-PGE_1 an Thrombozytenmembranen wurden Bindungsstellen mit hoher Affinität ($K_D^H = 1{,}3 \times 10^{-8}M$) und solche mit niedriger Affinität ($K_D^L = 2 \times 10^{-6}M$) nachgewiesen. Unmarkiertes PGE_1 inhibierte die Bindung des ^3H-PGE_1 an beide Populationen bei angewandten Konzentrationen, die diesen Dissoziationskonstanten entsprachen. $PGF_{2\alpha}$ hatte erst oberhalb $10^{-6}M$ eine inhibierende Wirkung; es wurde also nicht mit hoher Affinität gebunden.

Aus den Ergebnissen wird geschlossen, daß die hochaffinen Bindungsstellen Prostaglandin-Rezeptoren sind. Die niederaffine Bindung und die Fluiditätserhöhung der Membran könnten durch die gleiche Wechselwirkung von PGE_1 mit Membran-

lipiden ausgelöst sein. Da sie bei der gleichen PGE_1-Konzentration auftraten wie die Adenylatcyclase-Aktivierung, wird vorgeschlagen, daß Fluidisierung der Membran durch PGE_1 eine notwendige Voraussetzung für die Stimulierung des Enzyms durch Kollisions-Kopplung mit dem Rezeptor ist.

Herrn Professor Dr. E. Helmreich danke ich aufrichtig für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und für seine ständige Förderung durch wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Herr Professor Dr. J. Ströder von der Universitäts-Kinderklinik Würzburg hat mir durch seine wohlwollende Vermittlung ermöglicht, die vorliegende Arbeit im Physiologisch-chemischen Institut der Universität Würzburg anzufertigen. Ich danke ihm herzlich für sein Entgegenkommen und sein Interesse an meiner Arbeit.

Frau Dr. A. Bakarkjieva hat mich durch ständige Beratung bei der Planung und Durchführung der Experimente unterstützt. Ihr gilt daher mein besonderer Dank.

Herrn Dr. W. Burgermeister möchte ich für anregende Diskussionen und seine Hilfe bei der Formulierung des deutschen Textes herzlich danken.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. M. Zabel vom Institut für Biostruktur, Abteilung für Histologie und Embryologie der Medizinischen Akademie Poznań (Polen) für seine Hilfe bei den elektronenmikroskopischen Untersuchungen und Frau Dr. E. Gossrau vom Bayerischen Roten Kreuz Würzburg für die Überlassung des Blutmaterials.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Armstrong, J.M., Dusting, G.J., Moncada, S., Vane, J.R.: Cardiovascular actions of prostacyclin (PGI_2), a method of arachidonic acid which is synthesized by blood vessels. Circulat. Res., 1978, 43, suppl. I., 112-119

Bakardjieva, A., Galla, H.J., Helmreich, E.J.M.: Modulation of the beta-receptor adenylate cyclase interactions in cultured Chang liver cells by phospholipid enrichment. Biochemistry, 1979, 18, 316-323

Ball, G., Brereton, G.G., Fulwood, M., Ireland, D.M., Yates, P.: Effect of prostaglandin E_1 alone and in combination with theophylline or aspirin on collagen-induced platelet aggregation and on platelet nucleotides including adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate. Biochem. J., 1970, 120, 709-718

Biochemistry and pharmacology of platelets, A CIBA Foundation Symposium 35, Elsevier-Excerpta Medica-North Holland, Amsterdam 1975

Blackwell, G.J., Flower, R.J., Vane, J.R.: Some characteristics of the prostaglandin synthesizing system in rabbit kidney microsomes. Biochim. Biophys. Acta, 1975, 398, 178-190

Brunton, L.L., Wiklund, R.A., van Arsdale, P.M., Gilman, A.G.: Binding of [^{3}H] prostaglandin E_1 to putative receptors linked to adenylate cyclase of cultured cell clones. J. Biol. Chem., 1976, 251, 3037-3044

Brunton, L.L., Mayer, S.E.: Extrusion of cyclic AMP from pigeon erythrocytes. J. Biol. Chem., 1979, 254, 9714-9720

Burch, J.W., Majerus, P.W.: The role of prostaglandins in platelet function. Ser. Haemat., 1979, 16, 196-207

Caldwell, B.V., Burstein, S., Brock, W.A., Speroff, L.: Radioimmunoassay of the F prostaglandins. J. Clin. Endocr. Metabol., 1971, 33, 171-175

Carvalho, A.C.A., Colman, R.W., Lees, R.S.: Platelet function in hyperlipoproteinemia. N. Engl. J. Med., 1974, 290, 434-438

Chap, H.J., Zwaal, R.F.A., van Deenen, L.L.M.: Action of highly purified phospholipases on blood platelets. Biochim. Biophys. Acta, 1977, 467, 146-164

Cho, M.J., Allen, M.A.: Chemical stability of prostacyclin (PGI_2) in aqueous solutions.
Prostaglandins, 1978, 15, 943-954

Claesson, H.E., Malmsten, C.: On the interrelationship of prostaglandin endoperoxide G_2 and cyclic nucleotides in platelet function.
Eur. J. Biochem., 1977, 76, 277-284

Colacicco, G., Basu, M.K.: Surface behaviour of prostaglandins (PGs).
Prostaglandins, 1978, 16, 189-205

Colman, R.W.: Platelet function in hyperbetalipoproteinemia.
Thromb. Haemost., 1978, 39, 284-293

Cooper, H.A., Mason, R.G., Brinkhous, K.M.: The platelet: membrane and surface reactions.
Ann. Rev. Physiol., 1976, 38, 501-535

Crawford, N., Taylor, D.G.: Biochemical aspects of platelet behaviour associated with surface membrane reactivity.
Br. Med. Bull., 1977, 33, 199-206

Cuatrecasas, P.: Membrane Receptors.
Ann. Rev. Biochem., 1974, 43, 169-214

Danon, A., Heimberg, M., Oates, J.A.: Enrichment of rat tissues lipids with fatty acids that are prostaglandin precursors.
Biochim. Biophys. Acta, 1975, 388, 318-330

Day, H.J., Holmsen, H., Hovig, T.: Subcellular particles of human platelets.
Scan. J. Haematol., 1969, Supp. 7

van Dijck, P.W.M., Ververgaert, P.H.J.Th., Verkleij, A.J., van Deenen, L.L.M., De Gier, J.: Influence of Ca^{2+} on the thermotropic behaviour and permeability properties of liposomes prepared from dimyristoyl phosphatidylglycerol and mixtures of dimyristoyl phosphatidylglycerol and dimyristoyl phosphatidylcholine.
Biochem. Biophys. Acta, 1975, 406, 465-478

van Dorp, D.A., Beerthuis, R.K., Nugteren, D.H., Vonkeman, H.: Enzymatic conversion of all-cis-polyunsaturated fatty acids into prostaglandins.
Nature, 1964, 203, 839-841

Engelhard, V.H., Glaser, M., Storm, D.R.: Effect of membrane phospholipid compositional changes on adenylate cyclase in LM cells.
Biochemistry, 1978, 17, 3191-3200

von Euler, U.S.: On the specific vasodilating and plain muscle stimulating substance from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin).
J. Physiol., 1936, 88, 213-234

Falardeau, P., Hamberg, M., Samuelsson, B.: Metabolism of 8,11,14-eicosatrienoic acid in human platelets.
Biochem. Biophys. Acta, 1976, 441, 193-220

Galla, H.J., Sackmann, E.: Lateral diffusion in the hydrophobic region of membranes: use of pyrene excimers as optical probes.
Biochim. Biophys. Acta, 1974, 339, 103-115

Gorman, R.R., Bunting, S., Miller, O.V.: Modulation of human platelet adenylate cyclase by prostacyclin (PGX).
Prostaglandins, 1977, 13, 377-388

Gilman, A.G.: A protein binding assay for adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, 67, 305-312

Grant, C.W.M., McConnel, H.M.: Glycophorin in lipid bilayers.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 4653-4657

Gryglewski, R., Bunting, S., Moncada, S., Flower, R.J., Vane, J.R.: Arterial walls are protected against deposition of platelet thrombi by a substance (prostaglandin X) which they make from prostaglandin endoperoxides.
Prostaglandins, 1976, 12, 685-713

Hamberg, M., Samuelsson, B.: Detection and isolation of an endoperoxide intermediate in prostaglandin biosynthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 899-903

Hamberg, M., Svensson, J., Wakabayashi, T., Samuelsson, B.: Isolation and structure of two prostaglandin endoperoxides that cause platelet aggregation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1974, 71, 345-349

Hamberg, M., Svensson, J., Samuelsson, B.: Thromboxanes: a new group of biologically active compounds derived from prostaglandin endoperoxides.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 2994-2998

Handbook of Chemistry and Physics, 55th Edition, CRC Press, Inc., 1974, D-112

Hanski, E., Rimon, G., Levitzki, A.: Adenylate cyclase activation by the beta-adrenergic receptors as a diffusion-controlled process.
Biochemistry, 1979, 18, 846-853

Hartmann, W., Galla, H.J.: Binding of polylysine to charged bilayer membranes molecular organization of lipid-protein complex.
Biochim. Biophys. Acta, 1978, 509, 474-490

Harwood, J.P., Moskowitz, J., Krishna, G.: Dynamic interaction of prostaglandin and norepinephrine in the formation of adenosine 3',5'-monophosphate in human and rabbit platelets.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 261, 444-456

Haslam, R.J.: Role of adenosine diphosphate in the aggregation of human blood-platelets by thrombin and by fatty acids.
Nature, 1964, 202, 765-768

Hesketh, T.R., Smith, G.A., Houslay, M.D., McGill, K.A., Birdsall, N.J.M., Metcalfe, J.C., Warren, G.B.: Annular lipids determine the ATPase activity of a calcium transport protein complexed with dipalmitoyllecithin.
Biochemistry, 1976, 15, 4145-4151

Hirata, F., Axelrod, J.: Enzymatic methylation of phosphatidylethanolamine increases erythrocyte membrane fluidity.
Nature, 1978, 275, 219-220

Hirata, F., Strittmatter, W.J., Axelrod, J.: Beta-adrenergic receptor agonist increase phospholipid methylation, membrane fluidity, and beta-adrenergic receptor-adenylate cyclase coupling.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1979, 76, 368-372

Horrobin, D.F.: Prostaglandins Physiology, Pharmacology and Clinical Significance, 1978, Churchill Livingstone (Edinburgh)

Houslay, M.D., Hesketh, T.R., Smith, G.A., Warren, G.B., Metcalfe, J.C.: The lipid environment of the glucagon receptor regulates adenylate cyclase activity.
Biochim. Biophys. Acta, 1976, 436, 495-504

Insel, P.A., Nirenberg, P., Turnbull, J., Shattil, S.J.: Relationship between membrane cholesterol, alpha-adrenergic receptors, and platelet function.
Biochemistry, 1978, 17, 5269-5274

Jackson, R.L.: Current views on the organization of lipids and proteins in plasma membranes.
Receptors and Hormone Action (Academic Press, New York), 1977, 1, 411-446

Jaffe, B.M., Behrman, H.R., Parker, C.W.: Radioimmunoassay measurment of prostaglandins E, A, and F in human plasma.
J. Clin. Invest., 1973, 52, 398-405

Kimelberg, H.K., Papahadjopoulos, D.: Effects of phospholipid acyl chain fluidity, phase transitions, and cholesterol on ($Na^+ + K^+$)-stimulated adenosine triphosphatase.
J. Biol. Chem., 1974, 249, 1071-1080

Kloeze, J.: Influence of prostaglandins on platelet adhesiveness and platelet aggregation.
Prostaglandins, Proceedings of the II Nobel Symposium (Interscience, London), 1967, 241

Krishna, G., Harwood, J.P., Barber, A.J., Jamieson, G.A.: Requirement for guanosine triphosphate in the prostaglandin activation of adenylate cyclase of platelet membranes.
J. Biol. Chem., 1972, 247, 2253-2254

Kury, P.G., Ramwell, P.W., McConnell, H.M.: The effect of prostaglandins E_1 and E_2 on the human erythrocyte as monitored by spin labels.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1974, 56, 478-483

Küster, F.W., Fischbeck, K.: Logarithmische Rechentafeln, 1962, Walter De Gruyter & Co. (Berlin)

Lagarde, M., Dechavane, M., Rigaud, M., Durand, J.: Basal level of human platelet prostaglandins: PGE_1 is more elevated than PGE_2.
Prostaglandins, 1979, 17, 685-705

Lands, W.E.M., Samuelsson, B.: Phospholipid precursors of prostaglandins.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 164, 426-429

Lefkowitz, R.J., Mullikin, D., Wood, C.L., Gore, T.B., Mukherjee, C.: Regulation of prostaglandin receptors by prostaglandins and guanine nucleotides in frog erythrocytes.
J. Biol. Chem., 1977, 252, 5295-5303

Linden, C.D., Wright, K.L., McConnel, H.M., Fox, C.F.: Lateral phase separations in membrane lipids and the mechanism of sugar transport in Escherichia coli.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1973, 70, 2271-2275

Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurment with the Folin phenol reagent.
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265-275

Lüscher, E.F., Massini, P.: Common pathways of membrane reactivity after stimulation of platelets by different agents.
Biochemistry and Pharmacology of Platelets: Ciba Foundation Symposium 35; 1975 (Elsevier-Excerpta Medica - North Holland), 5-21, Amsterdam

Marcus, A.J., Zucker-Franklin, D., Safier, L.B., Ullman, H.L.: Studies on human platelet granules and membranes. J. Clin. Invest., 1966, 45, 14-28

Marcus, A.J.: The role of lipids in platelet function: with particular reference to the arachidonic acid pathway. J. Lip. Res., 1978, 19, 793-826

Marquis, N.R., Vigdahl, R.L., Tavorina, P.A.: Platelet aggregation, I. Regulation by cyclic AMP and Prostaglandin E_1. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 36, 965-972

Martin, F.J., MacDonald, R.C.: Lipid vesicle-cell interactions, III. J. Cell Biol., 1976, 70, 515-526

Mattson, J.C., Borgerding, P.J., Craft, D.L.: Fixation of platelets for scanning and transmission electron microscopy. Stain Technology, 1977, 52, 151-158

McDonald, J.W.D., Stuart, R.K.: Regulation of cyclic AMP levels and aggregation in human platelets by prostaglandin E_1. J. Lab. Clin. Med., 1973, 81, 838-849

Miller, O.V., Gorman, R.R.: Evidence for distinct prostaglandin I_2 and D_2 receptors in human platelets. J. Pharm. Exp. Ther., 1979, 210, 134-140

Mills, D.C.B., Smith, J.B.: The influence on platelet aggregation of drugs that affect the accumulation of adenosine 3' : 5'-cyclic monophosphate in platelets. Biochem. J., 1971, 121, 185-196

Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., Hayaishi, O.: Purification of prostaglandin endoperoxide synthetase from bovine vesicular gland microsomes. J. Biol. Chem., 1976, 251, 2629-2636

Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vane, J.R.: An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. Nature, 1976, 263, 663-665

Moncada, S., Vane, J.R.: Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessels walls. N. Engl. J. Med., 1979, 300, 1142-1147

Moore, W.V., Wolf, J.: Binding of prostaglandin E_1 to beef thyroid membranes. J. Biol. Chem., 1973, 248, 5705-5711

Nathan, I., Fleischer, G., Livne, A., Dvilansky, A., Parola, A.H.: Membrane microenvironmental changes during activation of human blood platelets by thrombin.
J. Biol. Chem., 1979, 254, 9822-9828

Nugteren, D.H., Hazelhof, E.: Isolation and properties of intermediates in prostaglandin biosyntheses.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, 326, 448-461

Orly, J., Schramm, M.: Fatty acids as modulators of membrane functions: Catecholamine activated adenylate cyclase of the turkey erythrocyte.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 3433-3437

van der Ouderra, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H., van Dorp, D.A.: Purification and characterisation of prostaglandin endoperoxide synthetase from sheep vesicular glands.
Biochim. Biophys. Acta, 1977, 487, 315-331

Pace-Asciak, C.R.: Oxidative biotransformations of arachidonic acid.
Prostaglandins, 1977, 13, 811-817

Pace-Asciak, C.R., Rangaraj, G.: Distribution of prostaglandin biosynthetic pathways in several rat tissues. Formation of 6-keto-prostaglandin $F_{1\alpha}$.
Biochem. Biophys. Acta, 1977, 486, 579-582

Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Nir, S., Isac, T.: Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurments concerning the effect of temperature and cholesterol.
Biochim Biophys. Acta, 1973, 311, 330-348

Papahadjopoulos, D., Poste, G., Schaeffer, B.E., Vail, W.J.: Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles.
Biochim. Biophys. Acta, 1974, 352, 10-28

Piper, P., Vane, J.R.: The release of prostaglandins from lung and other tissues.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1971, 180, 363-385

Platelets in biology and pathology, 1976, North-Holland Publishing Company (Amsterdam)

Platelets: A Multidisciplinary Approach, 1978, Raven Press, New York

Pohl, S.L., Krans, H.M.J., Kozyreff, V., Birnbaumer, L., Rodbell, M.: The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver, VI.
J. Biol. Chem., 1971, 246, 4447-4454

Puchwein, G., Pfeuffer, T., Helmreich, E.J.M.: Uncoupling of catecholamine activation of pigeon erythrocyte membrane adenylate cyclase by filipin.
J. Biol. Chem., 1974, 249, 3232-3240

Ramwell, P.W., Shaw, J.E., Douglas, W.W., Poisner, A.M.: Efflux of prostaglandin from adrenal glands stimulated with acetycholine.
Nature, 1966, 210, 273-274

Rao, Ch., V.: Characterization of prostaglandin receptors in the bovine corpus luteum cell membranes.
J. Biol. Chem., 1974, 249, 7203-7209

Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Krans, H.M.J.: The glucagon-sensitive adenyl cyclase system in plasma membranes of rat liver, V.
J. Biol. Chem., 1971, 246, 1877-1882

Rubalcava, B., Rodbell, M.: The role of acidic phospholipids in glucagon action on rat liver adenylate cyclase.
J. Biol. Chem., 1973, 248, 3831-3837

Sackmann, E., Albrecht, O., Hartmann, W., Galla, H.J.: Domain formation in lipid bilayers and biological membranes.
Structural and Kinetic Approach to Plasma Membrane Functions (Proceedings of a Meeting Held on September 6-9, 1976, in Grignon, France), 1977, Springer-Verlag Berlin - Heidelberg, 28-43

Salzman, E.W., Weisenberger, H.: Role of cyclic AMP in platelet function.
Advances in Cyclic Nucleotide Research (Raven Press, New York), 1972, 1, 231-247

Samuelsson, B.: Biosynthesis and metabolism of prostaglandins.
Proc. 4th Int. Congr. Pharmacol., Basle, Schwabe, Basle, 1970, 4, 12-31

Samuelsson, B., Goldyne, M., Granström, E., Hamberg, M., Hammarström, S., Malmsten, C.: Prostaglandins and thromboxanes.
Ann. Rev. Biochem., 1978, 47, 997-1029

Schafer, A.I., Cooper, B., O'Hara, D., Handin, R.I.: Identification of platelet receptors for prostaglandin I_2 and D_2.
J. Biol. Chem., 1979, 254, 2914-2917

Schultz, G., Böhme, E., Hardman, J.G.: Separation and purification of cyclic nucleotides by ion-exchange resin column chromatography.
Methods in Enzymology (Academic Press, New York), 1974, XXXVIII, 9-21

Sessa, G., Freer, J.H., Colacicco, G., Weissmann, G.: Interaction of a lytic polypeptide, melittin, with lipid membrane system.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 3575-3582

Shattil, S.J., Anaya-Galindo, R., Bennett, J., Colman, R.W., Cooper, R.A.: Platelet hypersensitivity induced by cholesterol incorporation.
J. Clin. Invest., 1975, 55, 636-643

Shattil, S.J., Cooper, R.A.: Membrane microviscisity and human platelet function.
Biochemistry, 1976, 15, 4832-4837

Shattil, S.J., Cines, D.B., Schreiber, A.D.: Increased fluidity of human platelet membranes during complement-mediated immune platelet injury.
J. Clin. Invest., 1978, 61, 582-589

Shaw, J.E., Gibson, W., Jessup, S., Ramwell, P.W.: The effect of PGE_1 on cyclic AMP and ion movements in turkey erythrocytes.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1971, 180, 241-260

Siegl, A.M., Smith, J.B., Silver, M.J., Nicolaou, K.C., Ahern, D.: Selective binding site for [^{3}H] prostacyclin on platelets.
J. Clin. Invest., 1979, 63, 215-220

Sinha, A.K., Shattil, S.J., Colman, R.W.: Cyclic-AMP metabolism in cholesterol-rich platelets.
J. Biol. Chem., 1977, 252, 3310-3314

Singer, S.J., Nicolson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membranes.
Science, 1972, 175, 720-731

Sixma, J.J., Lips, J.P.M.: Isolation of platelet membranes. A review.
Thrombos. Haemostas., 1978, 39, 328-337

Smith, J.B., Willis, A.L.: Formation and release of prostaglandins by platelets in response to thrombin.
Br. J. Pharmacol., 1970, 40, 545P-546P

Smith, J.B., Macfarlane, D.E.: Platelets.
The Prostaglandins (Plenum Press, New York), 1974, 2, 293-343

Stone, K.J., Willis, A.L., Hart, M., Kirtland, S.J., Kernoff, P.B.A., McNicol, G.P.: The metabolism of dihomo-gamma-linolenic acid in man.
Lipids, 1979, 14, 174-180

Strittmatter, P., Rogers, M.J.: Apparent dependence of interactions between cytochrome b5 and cytochrome b5 reductase upon translational diffusion in dimyristoyl lecithin liposomes.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1975, 72, 2658-2661

Tateson, J.E., Moncada, S., Vane, J.R.: Effects of prostacyclin (PGX) on cyclic AMP concentrations in human platelets.
Prostaglandins, 1977, 13, 389-397

Tolkovsky, A.M., Levitzki, A.: Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes.
Biochemistry, 1978, 17, 3795-3810

Träuble, H., Eibl, E.: in: Functional Linkage to Biomolecular Systems, 1975 (Raven Press, New York), 59-90

Tsai, B.S., Lefkowitz, R.J.: Agonist-specific effects of monovalent and divalent cations on adenylate cyclase-coupled alpha adrenergic receptors in rabbit platelets.
Mol. Pharmacol., 1978, 14, 540-548

Verkleij, A.J., Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Comfurius, P., Kastelijn, D., van Deenen, L.L.M.: The asymmetric distribution of phospholipids in the human red cell membrane.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, 323, 178-193

Verma, S.P., Wallach, D.F.H.: Effect of melittin on thermotropic lipid state transitions in phosphatidylcholine liposomes.
Biochim. Biophys. Acta, 1976, 426, 616-623

Vonkeman, H., van Dorp, D.A.: The action of prostaglandin synthetase on 2-arachidonyl-lecithin.
Biochim. Biophys. Acta, 1968, 164, 430-432

Wang, T.Y., Hussey, C.V., Garancis, J.C.: Effects of dibutyryl cyclic adenosinemonophosphate and prostaglandin E_1 on platelet aggregation and shape change.
Amer. J. Clin. Path., 1977, 67, 362-367

Warren, G.B., Toon, P.A., Birdsall, N.J.M., Lee, A.G., Metcalfe, J.C.: Reversible lipid titrations of the activity of pure adenosine triphosphatase-lipid complexes.
Biochemistry, 1974, 13, 5501-5507

Williams, L.T., Lefkowitz, R.J.: Receptor Binding Studies in Adrenergic Pharmacology, 1978 (Raven Press, New York)

Wolfe, S.M., Shulman, N.R.: Adenyl cyclase activity in human platelets.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 35, 265-272

Woods, B.P., Dennehy, A., Clarke, N.: Some observations on the preparation of platelet-rich plasma.
Thromb. Haemostas., 1976, 36, 302-310

Wunderlich, F., Ronai, A., Speth, V., Seelig, J., Bluma, A.: Thermotropic lipid clustering in Tetrahymena membranes.
Biochemistry, 1975, 14, 3730-3735

Zieve, P.D., Greenough, W.B.: Adenyl cyclase in human platelets: activity and responsiveness.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1969, 35, 462-466

Zwaal, R.F.A., Roelofsen, B., Colley, C.M.: Localization of red cell membrane constituents.
Biochim. Biophys. Acta, 1973, 300, 159-182

L e b e n s l a u f

Am 18. September 1952 wurde ich in Kraków als Sohn des Arztes Józef Mruk und der Zahntechnikerin Janina Mruk geb. Góral geboren. In den Jahren 1959 - 1965 besuchte ich die Kościuszkogrundschule und in den Jahren 1965 - 1969 die Allgemeinbildende Wyspiańskioberschule in Kraków, in welcher ich im Jahre 1969 das Abitur ablegte und das Reifezeugnis erhielt.

Im Jahre 1969 begann ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Medizinischen Akademie Kraków. Dort habe ich am 25. Juni 1975 das Diplom des Arztes (mit Auszeichnung) erhalten. In den Jahren 1973 und 1974 nahm ich teil an verschiedenen Praktika auf dem Gebiet der Pädiatrie, der Inneren Medizin und der Chirurgie an der Westminster Medical School in London sowie an einem Praktikum an der Pädiatrischen Universitätsklinik in Würzburg.

Am 1.10.1975 begann ich meine Berufstätigkeit an der Medizinischen Akademie in Kraków im Institut für Innere Medizin an der Klinik für Allergologie und Immunologie. 1978 legte ich eine Prüfung für die 1. Stufe der Ausbildung im Spezialfach Innere Medizin ab. Seit August 1978 bin ich am Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Würzburg tätig.

Würzburg, den 22. Februar 1980

Józef Mruk

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80